

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



**ACTIVIDADES BIOLÓGICAS E ESTRUTURAS SECRETORAS DE TRÊS  
ESPÉCIES DE ASTERACEAE DA FLORA AROMÁTICA PORTUGUESA**

**Ana Margarida Colaço Rodrigues**

Mestrado em Biologia Celular e Biotecnologia

2011

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



## **ACTIVIDADES BIOLÓGICAS E ESTRUTURAS SECRETORAS DE TRÊS ESPÉCIES DE ASTERACEAE DA FLORA AROMÁTICA PORTUGUESA**

**Ana Margarida Colaço Rodrigues**

Orientador Externo: Prof. Doutora Maria Luísa Serralheiro (Centro de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa).

Orientador Interno: Prof. Doutora Lia Ascensão (Centro de Biotecnologia Vegetal (IBB), Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa).

Mestrado em Biologia Celular e Biotecnologia

2011

*“Recomeça...  
Se puderes,  
Sem angústia  
E sem pressa.  
E os passos que deres,  
Nesse caminho duro  
Do futuro  
Dá-os em liberdade.  
Enquanto não alcances  
Não descanses.  
De nenhum fruto queiras só metade.*

*E, nunca saciado,  
Vai colhendo  
Ilusões sucessivas no pomar.  
Sempre a sonhar  
E vendo  
Acordado  
O logro da aventura.  
És homem, não te esqueças!  
Só é tua a loucura  
Onde, com lucidez, te reconheças.”*

**Miguel Torga** *Diário XIII*

## Agradecimentos

Às minhas orientadoras, Prof Doutora Lia Ascensão e Prof. Doutora Luísa Serralheiro, agradeço todo o apoio, disponibilidade, confiança e boa disposição sempre presente ao longo de todo o trabalho. À Prof. Doutora Lia Ascensão agradeço ainda todo o entusiasmo contagiante que despertou o meu interesse pela Biologia Vegetal e por este Projecto.

Aos meus amigos e colegas de laboratório do Departamento de Química e Bioquímica, em especial ao Pedro Falé, à Francesca Amaral, à Soraia Chaves e ao Pedro Cleto, por criarem um ambiente de trabalho único, pelo bom humor e apoio, que permitiram encarar até os momentos mais complicados sempre com alegria. Vou sentir saudades!

À Neusa pela disponibilidade e apoio nos ensaios de Microbiologia.

Ao Doutor Paulo Madeira e ao Prof. Doutor Carlos Cordeiro pela ajuda, disponibilidade e paciência na aquisição e interpretação dos espectros de espectrometria de massa.

A todos os meus amigos e colegas do Departamento de Biologia por todo o apoio e bom ambiente. Um muitíssimo obrigada ao Jorge Faria, Marta Mendes, Luísa Mota, Susana Silvestre, André Alcantâra, Nuno Gonçalves e ao Nuno Domingues por ter estado sempre presente e ter sido incansável em todo o apoio que me deu a nível profissional e pessoal.

A todos os meus queridos amigos que me ajudam todos os dias a ultrapassar os bons e maus momentos sempre com um sorriso.

À minha família, em especial à minha mãe, ao meu pai e ao meu irmão pela confiança, amor e apoio incondicionais que sempre demonstraram ao longo da vida.

A todas as pessoas que, directa ou indirectamente, me ajudaram a concluir este projecto.

A todos vós o meu, Muito Obrigada.

## Resumo

A Flora Portuguesa é muito rica em espécies aromáticas, utilizadas desde há séculos, em medicina tradicional sob a forma de “chás”, extractos aquosos obtidos por infusão ou decocção de partes de plantas pertencentes maioritariamente às famílias Asteraceae e Lamiaceae. Realizou-se um estudo de actividades biológicas e metabolismo *in vitro* de decocções de caules/folhas e flores de três espécies dunares da família Asteraceae (*Helichrysum italicum*, *Solidago virgaurea* e *Santolina impressa*) pertencentes à Flora Aromática Portuguesa. A morfologia e anatomia das estruturas secretoras destas espécies foram também estudadas e sua secreção caracterizada histoquimicamente.

Os extractos aquosos das três espécies em estudo apresentam uma elevada actividade biológica. Das três espécies estudadas, o extracto aquoso de flores de *H. italicum* apresenta as actividades antioxidante e inibitória de acetilcolinesterase mais elevadas, com valores de IC<sub>50</sub> de 10,14±0,02 µg/mL e 302,52±1,14 µg/mL, respectivamente. O extracto aquoso de caules/folhas de *H. italicum* também apresenta também uma maior inibição do crescimento bacteriano de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*, com MICs de 0,039 ± 0,0047 mg/mL e 0,056 ± 0,031 mg/mL, respectivamente.

Foi ainda estudado o metabolismo *in vitro* por acção dos sucos gástrico e pancreático artificiais como simulação da digestão dos extractos. Os resultados sugerem que os extractos aquosos não sofreram degradação, não tendo sido registadas alterações significativas tanto na sua composição química como nas actividades antioxidante e inibitória de acetilcolinesterase destas espécies. A digestão com a β-glucuronidase de *Escherichia coli* permite comprovar que nos extractos aquosos em estudo não existem compostos glucuronados.

Em relação à biodisponibilidade de compostos dos extractos aquosos verificou-se que quanto maior o tempo de retenção de um composto maior a sua permeabilidade através da membrana, o que sugere que não há necessidade de transportadores específicos. À excepção do extracto aquoso de caules/folhas de *H. italicum*, todos os restantes foram considerados como pouco citotóxicos para células HeLa e Caco-2, com valores de IC<sub>50</sub> superiores a 100 µg/mL.

As três espécies de Asteraceae em estudo apresentam nos órgãos vegetativos e florais um indumento misto, constituído por tricomas glandulares bisseriados e tricomas não glandulares, característicos deste género. Em *S. impressa* e *S. virgaurea* foram ainda observados canais secretores junto dos feixes vasculares. O estudo histoquímico permitiu concluir que as espécies secretam oleoresinas ricas em compostos fenólicos, provavelmente agliconas flavonólicas.

**Palavras chave:** Asteraceae, actividades biológicas, metabolismo *in vitro*, citotoxicidade, estruturas secretoras.

## Abstract

The Portuguese Flora is very rich in aromatic species used for centuries in traditional medicine in the form of "teas", that is aqueous extracts obtained by infusion or decoction of different parts of plants, mainly belonging to Lamiaceae and Asteraceae families. In the present work some biological activities were determined for the decoctions of stems/leaves and flowers of three Asteraceae species (*Helichrysum italicum*, *Santolina impressa* and *Solidago virgaurea*) collected from natural populations occurring throughout western Portugal sandy soils. The *in vitro* metabolism by the action of gastric and pancreatic artificial juices, as a simulation of the digestion of the extracts, was also evaluated. The morphology and anatomy of the secretory structures of these species were also studied, as well as the major classes of compounds present in its secretion.

Among the three species studied, the decoction of *H. italicum* flowers showed the highest antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activities with IC<sub>50</sub> values of  $10.14 \pm 0.02$  mg/mL and  $302.52 \pm 1.14$  mg/mL, respectively. The decoction of *H. italicum* stems/leaves also showed the highest inhibition of bacterial growth of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*, with MICs of  $0.039 \pm 0.0047$  mg/mL and  $0.056 \pm 0.031$  mg/mL, respectively.

The results of the *in vitro* metabolism revealed that decoctions did not suffer appreciable degradation, showing no significant changes both in its chemical composition and in its biological activities. Digestion with  $\beta$ -glucuronidase from *Escherichia coli* has demonstrated that the aqueous extracts don't have glucuronidated compounds.

In which concern the bioavailability of compounds from the aqueous extracts, it was found that as longer as the retention time of a compound, higher is its permeability through the membrane, suggesting that it is not required specific transporters. Except for the aqueous extract of *H. italicum* leaves, all the other extracts were considered non cytotoxic for HeLa and Caco-2 cells (IC<sub>50</sub>>100 mg/mL). The aqueous extract of *H. italicum* leaves showed an IC<sub>50</sub> of  $90 \pm 10$  mg/mL for Caco-2 cells.

The three species of Asteraceae studied have in their vegetative and floral organs a mixed indumentum consisting of biseriate glandular trichomes and non-glandular trichomes, characteristic of this genus. In *S. impressa* and *S. virgaurea* were also observed secretory ducts associated with the vascular bundles. The histochemical study showed that these species secrete oleoresins rich in phenolic compounds, probably flavonol aglycones.

**Key words:** Asteraceae, biological activities, *in vitro* metabolism, citotoxicity, secretory structures.

# Índice

<b>Agradecimentos</b>	<b>i</b>
<b>Resumo</b>	<b>ii</b>
<b>Abstract</b>	<b>iii</b>
<b>Abreviaturas e Siglas</b>	<b>vii</b>
<b>I. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>7</b>
1. Família Asteraceae	9
1.1. <i>Helichrysum italicum</i>	10
1.2. <i>Santolina impressa</i>	11
1.3. <i>Solidago virgaurea</i>	12
2. Actividades Biológicas de Extractos Vegetais	12
2.1. Actividade Antibacteriana	13
2.2. Actividade Antioxidante	14
2.3. Actividade Inibitória de Acetilcolinesterase	15
2.3.1. Doença de Alzheimer	15
2.3.1.1. Hipótese Colinérgica	16
2.3.2. Motilidade Gastrointestinal	18
2.3.3. Inibidores de acetilcolinesterase	19
<b>III. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL</b>	<b>21</b>
1. Materiais	23
1.1. Material Vegetal	23
1.2. Reagentes	23
1.3. Linhas Celulares	24
1.4. Equipamento	25
2. Procedimento Experimental	26
2.1. Preparação de Extractos Aquosos.	26
2.2. Determinação de Actividades Biológicas	26
2.2.1. Determinação da Actividade Antibacteriana: Inibição do Crescimento de	26
<i>Streptococcus mutans</i> e <i>Streptococcus sobrinus</i>	
2.2.2. Determinação da Actividade Antioxidante	26
2.2.3. Determinação da Inibição da Actividade de Acetilcolinesterase	27
2.3. Análise de Extractos Aquosos por HPLC-DAD	28

2.4. Identificação dos Compostos Maioritários dos Extractos Aquosos por Espectrometria de Massa (EM)	28
2.5. Ensaio de Metabolismo <i>in vitro</i> dos Extractos Aquosos	29
2.5.1. Digestão por Suco Gástrico Artificial	29
2.5.2. Digestão por Suco Pancreático Artificial	29
2.5.3. Digestão por $\beta$ -glucuronidase de <i>Escherichia coli</i>	30
2.6. Determinação da Citotoxicidade dos Extractos Aquosos	30
2.7. Estudo da Permeação da Barreira Intestinal e Biodisponibilidade de Compostos	31
2.8. Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM)	31
2.9. Microscopia Óptica (MO)	32
2.9.1. Anatomia e Histoquímica em Material Fixado	32
2.9.2. Histoquímica em Material Fresco	32
<b>IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>35</b>
1. Actividades Biológicas em Extractos Aquosos de <i>Helichrysum italicum</i> , <i>Santolina impressa</i> e <i>Solidago virgaurea</i>	37
1.1. Actividade Antibacteriana: Inibição do Crescimento de <i>Streptococcus mutans</i> e <i>Streptococcus sobrinus</i>	37
1.2. Actividade Antioxidante	39
1.3. Actividade Inibitória de Acetilcolinesterase	40
2. Identificação dos Constituintes dos Extractos Aquosos de <i>Helichrysum italicum</i> , <i>Santolina impressa</i> e <i>Solidago virgaurea</i>	42
2.1. <i>Helichrysum italicum</i>	42
2.2. <i>Santolina impressa</i>	46
2.3. <i>Solidago virgaurea</i>	49
3. Metabolismo <i>in vitro</i> dos Extractos Aquosos de <i>Helichrysum italicum</i> , <i>Santolina impressa</i> e <i>Solidago virgaurea</i>	52
3.1. Digestão dos Extractos Aquosos pelo Suco Gástrico Artificial	52
3.2. Digestão dos Extractos Aquosos pelo Suco Pancreático Artificial	55
3.3. Digestão dos Extractos Aquosos por $\beta$ -glucuronidase de <i>Escherichia coli</i>	58
4. Citotoxicidade dos Extractos Aquosos de <i>Helichrysum italicum</i> , <i>Santolina impressa</i> e <i>Solidago virgaurea</i>	61
5. Biodisponibilidade de Compostos dos Extractos Aquosos de <i>Helichrysum italicum</i> e <i>Solidago virgaurea</i>	62
6. Morfologia, Anatomia e Distribuição das Estruturas Secretoras e Caracterização	64



Histoquímica dos Secretados de *Helichrysum italicum*, *Santolina impressa* e *Solidago virgaurea*

7. Caracterização Histoquímica dos Secretados de <i>Helichrysum italicum</i> , <i>Santolina impressa</i> e <i>Solidago virgaurea</i>	69
7.1. Em Luz Visível	69
7.2. Em Luz Ultravioleta e na Banda do Azul	70
<b>V. ESTAMPAS</b>	<b>73</b>
<b>VI. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS</b>	<b>107</b>
<b>VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>111</b>
<b>/III. ANEXOS</b>	<b>I</b>

## Abreviaturas e Siglas

A $\beta$	Proteína $\beta$ -amilóide (do inglês <i>Amyloid <math>\beta</math>-protein</i> )
ACh	Acetilcolina (do inglês <i>Acetylcholine</i> )
AChE	Acetilcolinesterase (do inglês <i>Acetylcholinesterase</i> )
AChI	Iodeto de acetiltiocolina (do inglês <i>Acetylthiocholine iodide</i> )
AD	Doença de Alzheimer (do inglês <i>Alzheimer's Disease</i> )
BHA	Butil-hidroxianisol (do inglês <i>Butylated hydroxyanisole</i> )
BHI	Do inglês <i>Brain Heart Infusion</i>
BHT	Hidroxitolueno butilado (do inglês <i>Butylated hydroxytoluene</i> )
BuChE	Butirilcolinesterase (do inglês <i>Butyrylcholinesterase</i> )
EC <sub>50</sub>	Concentração eficiente (do inglês <i>Efficient concentration</i> ) correspondente a 50% de extinção do radical
Ch	Colina (do inglês <i>Choline</i> )
CoA	<u>C</u> oenzima <u>A</u>
DMEM	Do inglês <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido (do inglês <i>Dimethyl sulfoxide</i> )
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil (do inglês <i>2,2-diphenylpicrylhydrazyl</i> )
DTNB	5,5'-Ditiobis[2-ácido nitrobenzóico] (do inglês <i>5,5'-dithiobis[2-nitrobenzoic acid]</i> )
FBS	Soro fetal bovino (do inglês <i>Fetum bovine serum</i> )
HBSS	Do inglês <i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HCl	Ácido clorídrico (do inglês <i>Hydrochloric acid</i> )
Hepes	Ácido 4-2(hidroxietil)-1-piperazinoetanossulfônico (do inglês <i>4-(2-hydroxyethyl)1-piperazineethanesulfonic acid</i> )
HPLC-DAD	Cromatografia líquida de alta resolução (do inglês <i>High Precision Liquid Chromatography-Diod Array Detector</i> )
IC <sub>50</sub>	Concentração inibitória (do inglês <i>Inhibitory concentration</i> ) correspondente a 50% de inibição
LISU	Lisboa Universidade
m/z	Razão massa/carga do ião
MCT	Transportador de ácidos monocarboxílicos (do inglês <i>Monocarboxylic acid transporter</i> )
MIC	Concentração mínima inibitória (do inglês <i>Minimum inhibitory concentration</i> )
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	Cloreto de magnésio hexahidratado
MO	<u>M</u> icroscopia <u>ó</u> ptica

MTT	brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-1-il]-2,5-difenil-tetrazólio (do inglês 3-(4,5- <i>Dimethylthiazol-2-yl</i> )-2,5-diphenyltetrazolium bromide)
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NFT	Entrançamentos neurofibrilares (do inglês <i>Neurofibrillary tangles</i> )
PBS	Tampão de sais de fosfatos (do inglês <i>Phosphates buffer solution</i> )
PHF	Filamentos helicoidais emparelhados (do inglês <i>Paired helical filaments</i> )
Pen-Strep	Penicilina e estreptomicina (do inglês <i>Penycilin and streptomycin</i> )
ROS	Espécies reactivas de oxigénio (do inglês <i>Reactive oxygen species</i> )
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SEM	Microscopia electrónica de varrimento (do inglês <i>Scanning electronic microscopy</i> )
SP	Placas senís (do inglês <i>Senile plaques</i> )
TFA	Ácido trifluoracético (do inglês <i>Trifluoroacetic acid</i> )
Tr	Tempo de retenção
UA	Unidades de absorvência
WHO	<i>World Health Organization</i>



# I. Introdução

---



O Homem, desde tempos remotos, que usa plantas para fins medicinais. Os testemunhos mais antigos remontam ao Paleolítico, onde em tumbas com cerca de 60.000 anos foram encontradas as primeiras evidências de utilização de plantas medicinais (Lietava, 1992). As propriedades curativas das plantas, as formas como devem ser usadas e as características morfológicas que permitem o seu reconhecimento na Natureza foram conhecimentos empíricos, que o Homem foi acumulando e passando oralmente de geração em geração, até serem registados em documentos, após o surgimento da escrita. Os documentos mais antigos de que se tem conhecimento são provenientes da China, onde o Imperador Shen Nong, conhecido como “Agricultor Divino”, parece ter sido o autor de um manuscrito em que cita 350 plantas medicinais, refere o seu sabor e indica os seus usos terapêuticos (Sumner, 2000; Yang, 1998). Na bacia do Mediterrâneo, berço de numerosas civilizações antigas, é no Egito que nos surge o manuscrito mais antigo, o “*Papiro de Ebers*”, datado como sendo de 1500 BC, mas referindo conhecimentos que remontam a cerca de 3000 BC (Sumner, 2000). Na antiga Grécia são célebres as obras de Teofrasto, Hipócrates, Dioscórides e Galeno. “*De Materia Medica*” de Dioscórides, do 1º século AD, foi durante séculos no Ocidente e no mundo árabe, a obra de referência sobre plantas medicinais. Nela são descritas e ilustradas pela primeira vez cerca de 600 plantas medicinais e os seus respectivos modos de preparação, propriedades e efeitos secundários (Lev, 2002; Linford, 2007). A influência desta obra chega até ao Renascimento, época em que se começam a imprimir os primeiros Herbais, de entre os quais sobressai o de Paracelso, alquimista suíço, que expõe pela 1ª vez no Ocidente a “Doutrina das Assinaturas” (Linford, 2007). Originalmente da China, esta doutrina postula que as plantas possuem marcas atribuídas por Deus, como a forma, textura, sabor ou cor, que sugerem a sua utilização (Lev, 2002; Sumner, 2000).

Portugal, através de Garcia de Orta, que exerceu medicina em Goa, contribuiu para a difusão do conhecimento detalhado de várias espécies medicinais utilizadas no Oriente. Na sua obra *Colóquios dos Simples e Tratado das Drogas e Cousas Medicinais da Índia*, Garcia de Orta descreve em pormenor as plantas, refere as suas propriedades medicinais e o modo de utilização de várias espécies, que se conheciam muito mal na Europa, onde apenas alguns dos seus órgãos eram comercializados secos (Linford, 2007).

O conhecimento sobre o valor terapêutico das plantas, transmitido oralmente ou por escrito durante séculos, é hoje a base das diferentes farmacopeias. A Fitoterapia foi usada até à introdução dos primeiros fármacos químicos no início do século passado (World Health Organization [WHO],

2008). Actualmente este sistema de Medicina tradicional é ainda praticado, com especial incidência, nas sociedades não industrializadas e menos desenvolvidas. A Organização Mundial de Saúde (WHO, 2008) estima que 80% da população asiática e africana dependam deste sistema tradicional de saúde. Na Península Ibérica, os primeiros estudos etnobotânicos surgem apenas nos anos 80 (Camejo-Rodrigues, Ascensão, Bonet & Valles, 2003). Em Portugal, até há quarenta anos atrás as populações, em especial do interior, dependiam quase exclusivamente deste sistema tradicional de saúde, devido à falta de comunicação com os centros urbanos e à precariedade económica em que viviam.

A Flora Portuguesa é muito rica em espécies aromáticas, nomeadamente a família Asteracea, utilizadas desde há séculos em Medicina tradicional. De um modo geral, as plantas são administradas sob a forma de extractos aquosos obtidos por infusão ou decocção de folhas, flores, bolbos ou raízes. No entanto, apenas nos últimos anos os extractos de plantas começaram a ganhar interesse científico para pesquisa de fitofármacos, até então os investigadores privilegiaram a análise de extractos alcoólicos.

Os extractos aquosos contêm em geral diferentes tipos de compostos, entre os quais flavonóides e ácidos fenólicos, responsáveis por importantes actividades biológicas, tais como a actividade antioxidante, antimicrobiana e inibitória de enzimas. Muitas das espécies utilizadas em Medicina tradicional possuem actividade inibitória do enzima acetilcolinesterase, relacionada com o tratamento sintomático da Doença de Alzheimer (AD) e de doenças gastrointestinais (Ferreira, Proença, Serralheiro & Araújo, 2006; Jarvie, Celtek & Sanger, 2008). Muitos compostos, para além de inibirem este enzima, possuem também actividade antioxidante, minimizando os danos oxidativos associados a processos inflamatórios e também à AD (Smith, Rottkamp, Numomura, Raina & Perry, 2000). A actividade antimicrobiana dos produtos naturais é também uma importante área de estudo, nomeadamente na pesquisa de novos antibióticos e no tratamento de doenças periodontais (Costerton, Stewart & Greenberg, 1999; Palombo, 2009).

Os compostos activos presentes nos extractos aquosos, os vulgares chás de ervas, ao serem ingeridos, passam pelo tracto digestivo e têm de atravessar a barreira intestinal, de forma a entrarem no sistema circulatório e alcançarem o órgão alvo. Neste trajecto são submetidos à acção do suco gástrico e pancreático e podem sofrer alterações químicas que afectem as suas propriedades terapêuticas. Por outro lado, os produtos naturais ou as moléculas deles derivadas após a digestão, podem não atravessar o epitélio intestinal. Assim, são importantes estudos *in vitro* com sucos gástrico e pancreático artificiais e estudos de biodisponibilidade de compostos, que têm vindo a ser realizados em sistemas simuladores da permeação da barreira intestinal com células Caco-2, uma linha de células epiteliais de adenocarcinoma do colón-rectal (Hidalgo, Raub & Borchardt, 1989).



Do ponto de vista biotecnológico é também importante caracterizar as estruturas glandulares envolvidas na síntese e acumulação dos compostos que constituem os secretados das espécies vegetais, ricos geralmente em moléculas bioactivas. O estudo destas células glandulares contribui para a identificação dos compartimentos celulares envolvidos na síntese, transporte e eliminação desses compostos.

Apesar do número crescente de estudos fitoquímicos desenvolvidos em espécies da Flora Aromática e Medicinal, estima-se que apenas se conheçam as potencialidades farmacológicas de um número muito limitado de espécies. O estudo de extractos aquosos permite validar alguns dos usos etnobotânicos das espécies, na forma como são habitualmente consumidos pelas populações, sobre a forma de “chás”. A validação científica do potencial terapêutico dos remédios tradicionais à base de plantas é hoje absolutamente necessária para creditação de um produto vegetal como fármaco.

Com o presente trabalho pretende-se:

- Determinar a actividade antibacteriana contra *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*, duas das principais estirpes bacterianas responsáveis por doenças periodontais, em extractos aquosos (decoções) de caules/folhas e flores de três espécies de Asteraceae da Flora Aromática Portuguesa: *Helichrysum italicum* L. ssp. *picardi* Boiss & Reuter, *Santolina impressa* Hoffmanns & Link e *Solidago virgaurea* L.;
- Determinar as actividades antioxidante e inibitória do enzima acetilcolinesterase das três espécies de Asteraceae.
- Estudar *in vitro* a citotoxicidade dos extractos aquosos das três espécies em células HeLa e Caco-2;
- Estudar *in vitro* a acção do metabolismo gastrointestinal sobre as decoções destas três espécies de Asteraceae, utilizando sucos gástrico e pancreático artificiais e  $\beta$ -glucuronidase de *Escherichia coli*. Estudar a biodisponibilidade dos compostos através de um sistema simulador da permeação da barreira intestinal utilizando células Caco-2;
- Caracterizar a morfologia e anatomia das estruturas secretoras que ocorrem nos órgãos vegetativos e florais das três espécies de Asteraceae e estudar o seu padrão de distribuição nos diferentes órgãos. Caracterizar histoquimicamente as classes maioritárias de compostos que constituem os secretados destas três espécies.



## II. Revisão Bibliográfica

---



A Flora Portuguesa é muito rica em espécies aromáticas que são utilizadas desde há muitos séculos em medicina tradicional e na gastronomia, como condimento culinário e na preparação de licores. Algumas destas espécies são também de uso frequente na Europa, em particular na bacia do Mediterrâneo, sendo já referidas por Dioscórides. As espécies medicinais são principalmente utilizadas para uso interno sob a forma de decocção ou infusão das partes aéreas das plantas, podendo também ser utilizadas para uso externo sob a forma de alcoolatos e unguentos (Camejo-Rodrigues *et al.*, 2003). Em Portugal, apenas a partir de 1999, com o projecto “*Aromatic and/or Medicinal Plants in the National Network of Protected Areas*” se começou a investir na investigação etnobotânica de espécies da Flora Portuguesa com interesse industrial (Camejo-Rodrigues, 2007).

Os estudos etnobotânicos realizados em diversas áreas do território nacional mostraram que cerca de 38% das várias espécies medicinais e aromáticas, utilizadas pela população rural, pertencem à família Lamiaceae, Asteraceae, Rosaceae e Apiaceae (Camejo-Rodrigues *et al.*, 2003; Neves, 2009). Uma vez que os estudos etnobotânicos se iniciaram em Portugal há apenas duas décadas, apenas uma pequena parte do território nacional foi estudada (Camejo-Rodrigues, 2007).

## 1. Família Asteraceae

A família Asteraceae (Compositae), com cerca de 24000-30000 espécies incluídas em 1600-1700 géneros, tem uma distribuição cosmopolita, ocorrendo em todos os continentes, à excepção da Antártida, representando cerca de 10% das espécies de Angiospérmicas (Funk *et al.*, 2005; Gott *et al.*, 2010). As Asteraceae são plantas herbáceas anuais, apresentando raramente porte arbustivo ou arbóreo (Adedeji & Jewoola, 2008; Funk *et al.*, 2005). Apesar desta grande diversidade de porte, uma característica típica de todos os seus membros é a inflorescência em capítulo. Este encontra-se rodeado por um involúcro de uma ou mais séries de brácteas livres ou fundidas e as flores são actinomórficas ou zigomórficas, monóicas ou dióicas, sendo o ovário ínfero e bicarpelar e o estilete ramificado com dois estigmas (Adedeji & Jewoola, 2008).

As espécies da família Asteraceae são ricas em estruturas secretoras e apresentam uma grande variedade de actividades biológicas e farmacológicas que lhes conferem um estatuto importante no que se refere à procura de compostos bioactivos (Gott *et al.*, 2010; Vitto & Petenatti, 2009). As estruturas secretoras são formadas por células glandulares, células especializadas que ocorrem isoladas num tecido ou agrupadas constituindo um tecido glandular. Assim as estruturas

secretoras variam quanto à morfologia, função, posição e tipo de compostos que biossintetizam e acumulam. Os produtos de secreção produzidos por espécies da família Asteraceae são acumulados, de um modo geral, em idioblastos e tricomas glandulares, podendo ainda em alguns géneros estarem também depositados em canais secretores e laticíferos (Castro, Leitão-Filho & Monteiro, 1997; Meltcalfe & Chalk, 1950 citado em Duarte, Wolf & Paula, 2008). Os tricomas glandulares característicos das Asteraceae são pluricelulares e bisseriados, em que o secretado acumulado no espaço subcuticular é eliminado para o exterior por ruptura da cutícula (Meltcalfe & Chalk, 1988). Os canais resiníferos são em geral nas Asteraceae de origem esquizogénica, contendo oleoresinas ricas em poliacetilenos e lactonas sesquiterpénicas (Ascensão & Pais, 1987) e os laticíferos maioritariamente do tipo articulado anastomosado, contêm latices ricos em açúcares e lactonas sesquiterpénicas (Agrawal & Konno, 2009; Evert & Eichhorn, 2006). Nas Asteraceae a morfologia e distribuição das estruturas secretoras têm sido utilizadas para delimitar alguns géneros (Adedeji & Jewoola, 2008). A presença de estruturas secretoras responsáveis pela síntese de uma grande variedade de compostos que estão envolvidos na defesa química das plantas justificam o sucesso adaptativo das Asteraceae, reflectido no elevado número de espécies e ampla distribuição geográfica (Lopes, 1991).

### 1.1. *Helichrysum italicum*

O género *Helichrysum* Miller, incluído na sub-família Asteroideae, é considerado um dos maiores géneros da família Asteraceae, com cerca de 500-600 espécies herbáceas e arbustivas amplamente distribuídas no Sul da Europa, Sudoeste Asiático, Sul da Índia, África e Austrália (Ascensão *et al.*, 2001; Lourens, Viljoen & van Heerden, 2008). O termo *Helichrysum* deriva de dois vocábulos gregos, *helios*, que significa sol, e *chrysos* que refere a cor dourada das flores. *Helichrysum italicum* é uma espécie aromática mediterrânea com várias subespécies, ocorrendo em Portugal a subespécie *Helichrysum italicum* ssp. *picardi* Boiss & Reuter conhecida vulgarmente por perpétua-das-areias. Devido ao seu cheiro intenso a caril, *H. italicum* é denominado vulgarmente por *curry plant*, erva-caril. As suas flores amarelas combinam com o cheiro a caril, tornando-a um ícone do ambiente mediterrânico (Appendino *et al.*, 2007). Ocorre sob a forma de um pequeno arbusto aromático, com cerca de 40-50 centímetros de altura e desenvolve-se em solos secos e arenosos (Mastelic, Politeo, Jerkovic & Radosevic, 2005).

De um modo geral todas as espécies do género *Helichrysum* são grandes produtoras de metabolitos secundários como flavonóides, acetofenonas, floroglucinol, pironas, triterpenóides e sesquiterpenos (Lourens *et al.*, 2008), compostos que se acumulam nos tricomas glandulares bisseriados, característicos das Asteraceae (Ascensão, Silva, Barroso, Figueiredo & Pedro, 2001).

Estes produtos naturais são responsáveis pelas propriedades antibacteriana (Mastelic *et al.*, 2005), antiviral (Appendino *et al.*, 2007), antifúngica (Angioni *et al.*, 2003), antioxidante (Carini, Aldini, Furlanetto, Stefani & Facino, 2001; Tepe, Sokmen, Akpulat & Sokmen, 2005), anti-inflamatória (Appendino *et al.*, 2007; Sala, Recio, Giner, Máñez & Ríos, 2001), anti-alérgica (Carini *et al.*, 2001) e anti-diabética (Aslan, Orhan, Orhan, Sezik & Yesilada, 2007) de várias espécies de *Helichrysum* usadas em Medicina tradicional no tratamento de feridas e infecções (Euroğlu *et al.*, 2009; Lourens *et al.*, 2008). Desde a introdução do sistema médico Greco-Romano que *H. italicum* tem vindo a ser frequentemente utilizado pelas suas propriedades anti-inflamatória e anti-infecciosa (Appendino *et al.*, 2007; Carini *et al.*, 2001). No entanto, estudos recentes indicam que algumas espécies de *Helichrysum* podem ter efeitos genotóxicos e mutagénicos, pelo que o seu uso em medicina popular deve ser realizado com alguma prudência (Euroğlu *et al.*, 2009).

## 1.2. *Santolina impressa*

O género *Santolina* L. é nativo da zona mediterrânea, onde se encontra representado por mais de dez espécies aromáticas com porte sub-arbustivo (Guinoiseau, *et al.*, 2010). O termo *Santolina* deriva dos vocábulos latinos *Sanctum linum* que significa linho santo. É vulgarmente denominada abrótno-fêmea ou guarda-roupa, devido à sua utilização popular como forte repelente de insectos em armários ou estantes. *Santolina impressa* Hoffmanns & Link é uma espécie endémica de Portugal. Apresenta-se como um caméfito lenhoso de 35 a 80 cm de altura, com uma distribuição geográfica bastante restrita, ocorrendo em dunas litorais na área compreendida entre o Rio Sado e o Cabo de Sines (Rivero-Guerra, 2009).

Em algumas espécies de *Santolina* são encontrados ductos e tricomas glandulares pluricelulares e bisseriados, característicos das Asteraceae, cujas secreções, oleoresinas e óleos essenciais, respectivamente, contêm para além de terpenóides, alcalóides e flavonóides (Pagni, Orlando, Masini & Ciccarelli, 2003). Nos tricomas glandulares são ainda encontradas pectinas e taninos (Pagni *et al.*, 2003). Nos óleos essenciais de espécies do género *Santolina* estão presentes monoterpenos irregulares (Liu *et al.*, 2007).

Diversas espécies do género *Santolina* têm sido utilizadas em Medicina popular no tratamento de distúrbios gastrointestinais (Cavero, Akerreta & Calvo, 2011). Vários compostos isolados de espécies de *Santolina* mostraram ter actividade anti-inflamatória (Sala, Recio, Giner, Máñez & Ríos, 1999), anti-espasmolítica (Giner, Ríos & Villar, 1989) anti-fúngica (Suresh, Sriram, Dhanaraj, Elango & Chinnaswamy, 1997), anti-bacteriana (Liu *et al.*, 2007) e anti-viral (Logu, Loy, Pellerano, Bonsignore & Schivo, 2000).

### 1.3. *Solidago virgaurea*

Das cerca de 130 espécies herbáceas perenes do género *Solidago* L., a grande maioria é nativa da América do Norte, sendo também encontradas no México, América do Sul e Eurásia (Priede, 2008). *Solidago virgaurea* L. é a única espécie nativa da Europa, (Johnson, Hull-Sanders & Meyer, 2007), onde é conhecida por vara-dourada. As suas propriedades cicatrizantes deram origem ao termo *Solidago*, do latim, *solidare*, solidificar, enquanto *virgaurea* se refere à cor dourada das suas flores (Weber & Jakobs, 2005). É uma espécie perene e resistente com cerca de 80 cm de altura, que ocorre em solos bem drenados e arenosos (Linford, 2007).

As espécies de *Solidago* são ricas em flavonóides, saponinas e glucósidos fenólicos (Weber & Jakobs, 2005). Para além dos tricomas bisseriados característicos das Asteraceae, ocorrem também nas espécies de *Solidago* canais e bolsas secretoras (Anderson & Creech, 1975). De um modo geral a maioria das espécies de *Solidago* possuem propriedades antioxidante (Apáti *et al.*, 2003) e analgésica, como demonstrado por Silva *et al.* (2010) com aplicação no combate à dor lombar. Devido às suas propriedades anti-inflamatória, cicatrizante, antimicrobiana e diurética, *S. virgaurea* é utilizada tradicionalmente no tratamento de infecções e de doenças do tracto urinário, como a nefrolitíase e doenças da próstata (Demir, Açıık, Bali, Koç & Kaynak, 2009; Gross *et al.*, 2002; Melzig, 2004; Yarnell, 2002). Em estudos recentes foi demonstrado uma actividade antineoplásica significativa em células tumorais da próstata (Gross *et al.*, 2002). À excepção de casos de falência renal, até ao momento não são conhecidas contra-indicações para esta planta (Yarnell, 2002). Apesar de bastante popular na medicina tradicional, não existem ainda estudos que comprovem a sua segurança no tratamento de humanos.

## 2. Actividade Biológica de Extractos Vegetais

O uso de plantas medicinais está intimamente relacionado com a ocorrência de produtos naturais bioactivos que podem ser utilizados na cura e prevenção de várias doenças. Derivados naturais de plantas têm recebido uma crescente aceitação e creditação na indústria farmacêutica, cosmética e alimentar. Apesar do grande número de espécies vegetais existentes no planeta, a maioria é desconhecida sob o ponto de vista científico, sendo que entre 250-500 mil espécies vegetais, somente cerca de 5% têm sido estudadas fitoquimicamente e uma percentagem ainda menor avaliadas sob os aspectos biológicos (Filho & Yunes, 1998). Estudos farmacocinéticos e de toxicidade apontam os produtos naturais como bons candidatos para o desenvolvimento de novos fármacos (Geissler *et al.*, 2010). Várias substâncias extraídas de plantas, com actividade biológica comprovada, são já utilizadas para produção biotecnológica. A análise da composição dos fármacos



de prescrições dispensadas de empresas farmacêuticas dos Estados Unidos entre 1959 e 1980, mostram que 25% dos fármacos continham extractos de espécies vegetais ou princípios activos derivados de plantas superiores e pelo menos 119 compostos químicos são derivados de 90 espécies vegetais, dos quais 74% resultaram de estudos de isolamento de substâncias bioactivas de plantas utilizadas em Medicina tradicional (Gurib-Fakim, 2006). Na área dos produtos anti-infecciosos e tratamento de cancro, cerca de 70% dos fármacos utilizados são derivados de produtos naturais (Gurib-Fakim, 2006). São exemplo desses compostos bioactivos o anticancerígeno taxol, alcalóide diterpénico extraído de plantas do género *Taxus* (Malik *et al.*, 2011) e a artemisinina, lactona sesquiterpénica extraída da Asteraceae *Artemisia annua*, com potente actividade antimalária (Kamchonwongpaisan & Meshnick, 1996) ou

## 2.1. Actividade Antibacteriana

Os agentes antimicrobianos naturais têm sido estudados para dar resposta a várias questões relacionadas com o controlo de microorganismos, tais como, redução da necessidade de antibiótico, controlo de contaminações, extensão do prazo de validade de produtos alimentares, diminuição do desenvolvimento de resistência a antibióticos por microorganismos patogénicos ou reforço do sistema imunitário humano (Tajkarimi, Ibrahim & Cliver, 2010). Uma importante área de estudo de agentes antimicrobianos consiste na sua aplicação em doenças periodontais, em que o maior desafio prende-se com a resistência do biofilme bacteriano face a bacteriófagos e a outros biocidas quimicamente diversos (Costerton *et al.*, 1999).

Doenças periodontais e cáries dentárias são as patologias dentárias mais comuns nos humanos, causadas por bactérias e fungos formadores de placas na cavidade oral (More, Tshikalange, Lall, Botha & Meyer, 2008). Estas patologias estão normalmente associadas com estirpes de *Actinomyces*, *Actinobacillus*, *Streptococcus* e *Candida* (More *et al.*, 2008). Estes fungos e bactérias sésseis formam o chamado biofilme bacteriano, ou placa dentária, um modo de crescimento protegido que permite a sobrevivência dessas estirpes num ambiente hostil (Costerton *et al.*, 1999). O desenvolvimento da cárie dentária envolve bactérias Gram-positivas, como *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*, responsáveis pela metabolização de açúcares em ácidos orgânicos que dissolvem o fosfato de cálcio presente nos dentes levando à sua descalcificação e eventual queda (Palombo, 2009). *Streptococcus mutans* e *S. sobrinus* são dois patógenos altamente cariogénicos, que aderem à superfície de esmalte dos dentes por ligações hidrofóbicas e pela síntese de um glucano insolúvel através da produção do enzima glucosiltransferase (Nostro *et al.*, 2004). Este enzima catalisa a introdução de uma molécula de glucose, a partir da decomposição de sacarose, em glucanos adesivos e contribui significativamente para a formação da placa dentária.

Recentemente, os produtos naturais têm sido apresentados como uma alternativa aos compostos químicos usados para prevenção da saúde oral (Palombo, 2009). Por outro lado, admite-se que o seu uso possa dar origem a um menor número de efeitos secundários que os produtos de síntese química. O uso de partes de plantas como substituto de escova de dentes e de elixires dentários para tratamento e manutenção da higiene oral, é frequente entre as populações autóctones de África (Cowan, 1999). Do ponto de vista etnobotânico são várias as espécies descritas pelas suas propriedades anti-odontálgicas, nomeadamente espécies pertencentes à família Asteraceae e ao género *Helichrysum* (Rivera & Obón, 1993).

## 2.2. Actividade Antioxidante

Muitas plantas produzem antioxidantes naturais em resposta à presença de espécies oxidantes. Reacções com espécies oxidantes podem conduzir à formação de radicais livres e, por sua vez, a sua acumulação leva à ocorrência de stress oxidativo devido ao desequilíbrio entre a geração de espécies reactivas de oxigénio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*), ou de azoto e os enzimas antioxidantes. Estas entidades químicas de oxigénio e azoto, possuem electrões desemparelhados o que as torna instáveis e capazes de reagir com os lípidos, proteínas e ácidos nucleicos, levando a alterações nas funções celulares e, em último caso, à morte celular. São exemplo de ROS, o anião superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidróxilo ( $OH^{\cdot}$ ), óxido nítrico (NO) e espécies não radicais como o peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ).

O uso de antioxidantes sintéticos, como o butil-hidroxianisol (BHA) ou hidroxitolueno butilado (BHT), requer estudos de toxicidade detalhados para garantir a sua segurança devido aos seus possíveis efeitos mutagénicos e carcinogénicos (Ames, 1983; Tepe *et al.*, 2005). Na pesquisa de antioxidantes naturais, os compostos fenólicos extraídos de plantas têm merecido especial atenção devido às suas propriedades redox, que permitem a sua actuação como agentes redutores, dadores de hidrogénio, ou *quenchers* de singletos de oxigénio (Aiyegoro & Okoh, 2009). Dos compostos fenólicos, os flavonóides são o grupo mais comum na dieta humana, presentes em relativa abundância entre os metabolitos secundários que ocorrem nas plantas (Spencer, 2008). Apesar das múltiplas actividades atribuídas aos flavonóides, tais como anti-inflamatória, inibidora enzimática, antimicrobiana, anti-alérgica e anti-tumoral, a actividade antioxidante é sem dúvida a mais estudada (Pereira, Valentão, Pereira & Andrade, 2009). A grande concentração de antioxidantes encontrada em plantas deve-se à necessidade de protecção das células vegetais contra os radicais livres gerados pelo stress oxidativo, provocado pela exposição aos raios solares e ao oxigénio. Como antioxidantes naturais destacam-se o ácido ascórbico, a vitamina E e o  $\beta$ -caroteno.

São vários os compostos extraídos de espécies de Asteraceae que têm sido estudados pelas suas propriedades antioxidantes. O arzenol, o maior componente não-volátil identificado em extractos orgânicos de *H. italicum microphyllum*, tem sido estudado pelo seu papel protector contra a degradação de lípidos em casos de stress oxidativo de sistemas biológicos, como membranas celulares e lipoproteínas de baixa densidade, responsáveis por problemas como a arteriosclerose (Rosa *et al.*, 2011).

A produção de ROS, com o consequente risco de ocorrência de stress oxidativo no ser humano, é desencadeada pela exposição a pesticidas, solventes orgânicos, poluentes, fumo de tabaco, entre outros (Gulcin, Oktay, Kireççi & Kufrevioglu, 2003). Este stress ocorre em consequência de várias condições clínicas como cancro, problemas cardiovasculares, neurodegenerativos, do tracto gastrointestinal e até do próprio processo de envelhecimento (Aruoma, 1998). O cérebro é um órgão particularmente vulnerável ao stress oxidativo, o que leva a colocar como hipótese a existência de uma correlação entre este tipo de stress e as doenças neurodegenerativas, como por exemplo, a Doença de Alzheimer ou a de Parkinson (Bilušić *et al.*, 2008; Spencer, 2008).

## **2.3. Actividade Inibitória de Acetilcolinesterase**

### **2.3.1. Doença de Alzheimer**

A Doença de Alzheimer (AD) é uma desordem neurodegenerativa progressiva que provoca a demência. É muito frequente em populações envelhecidas, em especial nos países desenvolvidos, onde a esperança média de vida é cada vez maior (Pimplikar, 2009). Esta forma de demência, hoje em dia muito comum, afecta mais de 10% da população com idade superior a 65 anos e 30-35% das pessoas com idade acima dos 85 anos (Bachurin, 2003). Neurologicamente, as manifestações iniciais incluem um declínio cognitivo e da memória a curto prazo, perda de memória espacial e desequilíbrio emocional, que à medida que a doença progride se torna mais severas podendo levar à perda total das funções cognitivas (Pimplikar, 2009).

Neuropatologicamente a AD é caracterizada pela perda de neurónios e redução no tamanho dos lobos cerebrais frontais e temporais, regiões que estão envolvidas nos processos de aprendizagem e memória. Observa-se nos neurónios uma acumulação progressiva de filamentos helicóidais emparelhados (PHF, do inglês *paired helical filaments*), como os entrançamentos neurofibrilares (NFT, do inglês *neurofibrillary tangles*), assim como de fibras amilóides em placas neuríticas ou senis (SP, do inglês *senile plaques*), que estão também presentes nas paredes dos vasos sanguíneos (Chauchan & Chauchan, 2006). A principal proteína amilóide relacionada com a AD é a  $\beta$ -amilóide ( $A\beta$ ), resultante da proteólise da proteína precursora amilóide, uma proteína

transmembranar. A A $\beta$  tem capacidade de se agregar, formando fibrilhas insolúveis que dão origem a formações densas, as SP, que se depositam extracelularmente e, por sua vez, desencadeiam uma resposta inflamatória dando origem a um microambiente oxidativo (Chauchan & Chauchan, 2006).

As abordagens terapêuticas para a AD têm sido baseadas nas suas características morfo-anatómicas e bioquímicas. Tem-se procurado desenvolver agentes que contrariem o hipofuncionamento do sistema colinérgico, interferiram no metabolismo da A $\beta$ , protejam os neurónios de metabolitos tóxicos formados no processo neurodegenerativo e intervenham no processo de formação de NFT nos neurónios. Para além disso, têm-se procurado agentes anti-inflamatórios que previnam a resposta negativa dos neurónios ao processo patológico (Bachurin, 2002). No entanto, a heterogenidade de factores etiológicos dificultam a identificação do factor clínico mais importante e determinante para a progressão da doença (Calabrese *et al.*, 2003).

Em Medicina tradicional, várias espécies vegetais têm sido utilizadas para o tratamento de desordens cognitivas, incluindo a doença de Alzheimer (Mukherjee, Kumar, Mal & Houghton, 2007). Propriedades como a actividade anti-inflamatória, antioxidante e inibitória do enzima acetilcolinesterase têm vindo a ser estudadas, em extractos de plantas, para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para esta doença (Howes, Perry & Houghton, 2003). Na última década tem havido um particular interesse no estudo de plantas e especiarias incluídas na dieta humana, ricas em compostos fenólicos e conhecidas pelas suas propriedades antioxidantes (Calabrese *et al.*, 2003).

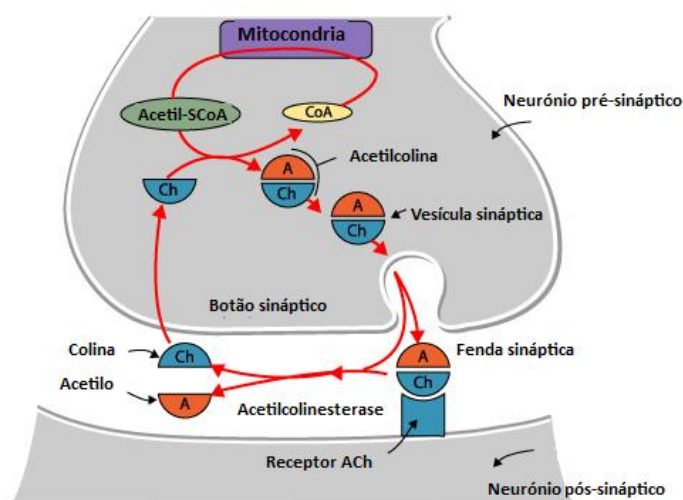
A relação da AD com a formação de radicais livres e danos por stress oxidativo é uma das abordagens cada vez mais frequente em estudos desta doença (Smith *et al.*, 2000). Durante os últimos anos, a análise *post-mortem* de cérebros de doentes com AD tem revelado elevados níveis de produtos finais de oxidação, sob a forma de modificações oxidativas proteicas, oxidação de DNA e RNA e peroxidação dos lípidos de membrana (Steele *et al.*, 2007). No entanto a pesquisa do controlo da doença por efeitos biológicos, como a inibição da acetilcolinesterase (AChE) por plantas tradicionalmente utilizadas em infusões como remédios caseiros ou como especiarias ou condimentos (Ingkanimi *et al.*, 2003; Heinrich & Teoh, 2004; Mata *et al.*, 2007), continua a ter uma grande importância na procura de novos grupos de moléculas que possam ser utilizados na terapia e que sem a toxicidade encontrada nos compostos de síntese química (Ferreira *et al.*, 2006).

### 2.3.1.1. Hipótese Colinérgica

Apesar das várias hipóteses existentes para abordar terapeuticamente a doença de Alzheimer, a hipótese colinérgica parece ser a que tem maior sucesso. Os inibidores da AChE foram o primeiro grupo de fármacos aprovados para o tratamento sintomático da AD, actuando no sentido

de restaurar o nível de acetilcolina no cérebro, prolongando assim a neurotransmissão colinérgica (Bauchurin, 2002; Heinrich & Teoh, 2004). Conhecem-se actualmente dois tipos de colinesterases, acetil e butiril (AChE e BuChE), ambos encontrados nas SP. A função fisiológica da BuChE ainda não é conhecida, mas os níveis deste enzima parecem aumentar o progresso da AD, enquanto os níveis de AChE o diminuem (Heinrich & Teoh, 2004).

A acetilcolina (ACh) existe nas fendas sinápticas e está envolvida na transmissão de sinal entre os neurónios (Figura 1). A sua associação com a AD foi descoberta por White *et al.* (1977), que ao examinar cérebros de pacientes com esta doença, descobriram uma deficiência em ACh. A ACh é sintetizada pela colina acetiltransferase a partir de colina (Ch) e acetil-CoA e transportada para vesículas sinápticas pelo transportador vesicular de acetilcolina. A força motriz para o transporte de ACh é dada pelo gradiente de pH entre o citoplasma e o lúmen da vesícula, que se encontra acidificado devido à presença, na membrana das vesículas, de uma bomba de prótons dependente de ATP (Rand, 2007). A ACh é libertada por exocitose para a fenda sináptica e activa os receptores de ACh muscarínicos e/ou nicotínicos localizados nas células pós-sinápticas (Palaire, Grozio, Cesario & Russo, 2008; Rand, 2007). Este neurotransmissor é inactivado por uma reacção de hidrólise catalisada pelo enzima AChE, na fenda sináptica, de que resulta uma molécula de Ch e um grupo acetilo. A Ch resultante é transportada de volta para o neurónio pré-sináptico por um transportador de alta afinidade para síntese de ACh adicionais (Rand, 2007). A ACh está ainda envolvida na regulação de funções celulares vitais, tais como proliferação, diferenciação, organização do citosqueleto, contacto célula-célula, actividade ciliar, migração, secreção e absorção de iões, água e mucos (Palaire *et al.*, 2008).



**Figura 1** - Modelo colinérgico. A acetilcolina (ACh) é sintetizada a partir da colina (Ch) e acetil-CoA e transportada para vesículas sinápticas, de onde é libertada por exocitose para a fenda sináptica. Aí activa os receptores de ACh localizados nas células pós-sinápticas. A ACh é inactivada pelo enzima acetilcolinesterase (AChE), na fenda sináptica, resultando uma molécula de Ch e um grupo acetilo (A). A Ch resultante é transportada de volta para o neurónio pré-sináptico por um transportador de alta afinidade para síntese de AChs adicionais (Rand, 2007). Figura adaptada de: *The neuromuscular junction*; <http://www.frca.co.uk/article.aspx?articleid=228>.

### 2.3.2. Motilidade Gastrointestinal

A motilidade gastrointestinal define-se como o conjunto de movimentos responsáveis pela mistura e circulação dos conteúdos gastrointestinais, impulsionando-os ao longo de todo o tracto digestivo. Os movimentos peristálticos do intestino consistem em ondas de contração muscular circulares que levam à propulsão dos conteúdos intestinais e são controladas por vias inibitórias e excitatórias do sistema nervoso entérico (Holzer & Maggi, 1994).

O enzima AChE encontra-se presente nas células epiteliais do intestino (Sinne, Ferrand, Cloarec, Lehur & Colas, 1991), onde a ACh é um dos principais neurotransmissores envolvidos no controlo dos movimentos peristálticos, nomeadamente na contração ascendente (Jarvie *et al.*, 2008). A ACh é um dos reguladores biológicos mais importantes do transporte iónico, controlando o movimento da água no intestino (Hirota & McKay, 2006). Assim, alterações no metabolismo colinérgico podem ter particular importância na função intestinal normal (Davis, Masella, & Blennerhassett, 1998). No sistema nervoso entérico, inibidores de AChE previnem a degradação de ACh, aumentando a sua disponibilidade e, consequentemente, a motilidade gastrointestinal (Jarvie *et al.*, 2008). Uma motilidade gastrointestinal saudável depende da coordenação entre as vias neuronais extrínsecas (simpática e parassimpática) e intrínsecas (entérica), o sistema de circuitos neuroendócrinos e a excitabilidade do músculo liso (Pasha, Lunsford & Lennon, 2006).

A forma BChE é também encontrada abundantemente no intestino de mamíferos, podendo contribuir para a degradação de ACh (Hirota & McKay, 2006). No entanto, a inibição de AChE no sistema nervoso entérico apresenta um maior impacto e menor número de efeitos secundários, como náuseas e vômitos, quando comparado com a inibição de BChE (Jarvie *et al.*, 2008). Apesar de a ACh ser o principal neurotransmissor responsável pela motilidade intestinal, após inibição dos seus receptores podem ainda ser observados alguns movimentos peristálticos, evidenciando assim a presença de outros neurotransmissores excitatórios não-colinérgicos de controlo peristáltico, que funcionam em sinergia com o sistema colinérgico (Holzer & Maggi, 1994).

Os inibidores de AChE apresentam-se assim como potenciais formas de tratamento para problemas relacionados com uma motilidade gastrointestinal inadequada (Jarvie *et al.*, 2008). Actualmente os inibidores de AChE mais utilizados são a metoclopramida, a neostigmina e derivados de ranitidina (Shasho *et al.*, 1994). No entanto, ao longo do tracto digestivo estes inibidores dão origem a uma grande variedade de efeitos secundários e a diferentes níveis de eficácia, sendo assim importante o estudo comparativo entre os efeitos dos inibidores de AChE e a função gastrointestinal (Jarvie *et al.*, 2008). Por exemplo, um composto considerado diarreico mimetiza a acção colinérgica e aumenta a amplitude dos movimentos gastrointestinais por estimulação da contração do tecido

muscular intestinal (Gnahuoé, N'guessan, Koffi, Traoré & Guédé-Guina, 2009). Os distúrbios na motilidade do tubo digestivo estão associados a doenças gastrointestinais como a disfagia, estase gástrica, vômitos, dores abdominais, paralisia do íleo e prisão de ventre (Shasho *et al.*, 1994). Actualmente são ainda escassos os estudos em ratos e humanos nomeadamente no contexto de formulação de modelos e tratamento de patologias gastrointestinais (Hirota & McKay, 2006). No contexto de produtos naturais, várias espécies têm sido utilizadas empiricamente contra doenças gastrointestinais, nomeadamente do género *Santolina* (Cavero *et al.*, 2011; Tajkarimi *et al.*, 2010).

### 2.3.3. Inibidores de Acetilcolinesterase

Os inibidores de AChE são actualmente a melhor farmacoterapia para pacientes com Alzheimer. Ao longo da última década alguns destes inibidores foram licenciados para uso clínico no tratamento sintomático da AD, em estádios mais iniciais da doença, retardando a sua progressão (Howes *et al.*, 2003). A primeira geração de inibidores desenvolvidos para aplicação terapêutica exibia uma eficácia clínica moderada, devido à sua baixa organoespecificidade e inibição não específica do enzima, inibindo também o enzima BuChE. Para além disso, esses fármacos apresentavam efeitos secundários indesejáveis, sendo sedativos e hepatotóxicos (Bauchurin, 2002). A tacrina, o primeiro inibidor de AChE aprovado em alguns países, no final dos anos 80, para tratamento da AD (Francis, Palmer, Snape & Wilcock, 1999) apresentava como efeitos secundários náuseas, vômitos, diarreia e perda de peso, possivelmente devido à inibição indesejada de BuChE (Geisser *et al.*, 2010). O desenvolvimento de uma segunda geração de inibidores permitiu contornar os problemas relacionados com a sua toxicidade, exibindo também uma maior especificidade na inibição do enzima (Bauchurin, 2002).

Actualmente são recomendados três inibidores de AChE: donepezil, rivastigmina e mais recentemente, a galantamina. A galantamina, um alcalóide isolado pela primeira vez a partir de espécies do género *Galanthus* (Amaralidaceae), é hoje obtido também de *Narcissus* spp. e *Leucojum* spp. (Amaralidaceae) e por síntese química (Heinrich & Teoh, 2004). Este alcalóide inibe a agregação do péptido A $\beta$  em SP e a toxicidade apresentada após a sua agregação (Matharu *et al.*, 2009). Recentemente têm sido desenvolvidos vários inibidores de AChE para potencial aplicação terapêutica na AD, embora difiram na sua actividade farmacológica, nomeadamente no mecanismo de inibição competitivo e não-competitivo (Francis *et al.*, 1999).





### III. Procedimento Experimental

---



## 1. Materiais

### 1.1. Material Vegetal

Utilizaram-se neste trabalho ramos vegetativos e florais de *Helichrysum italicum* Miller, *Santolina impressa* L. e *Solidago virgaurea* L., Asteraceae colhidas em populações naturais, que ocorrem em terrenos arenosos entre a Comporta e Melides. Os extractos de *H. italicum* e *S. impressa* foram preparados de amostras colhidas em 2010 na região atrás referida e os de *S. virgaurea* realizados com amostras colhidas em Alcobaça na mesma época do ano. Para a caracterização morfológica e anatómica das estruturas glandulares e para o estudo histoquímico dos secretados utilizou-se material colhido a Sul do Tejo durante os meses de Maio e Junho de 2011.

Das três espécies foram feitas excisas que se encontram depositadas no LISU (Herbário do Jardim Botânico da Universidade de Lisboa) com os seguintes códigos: *H. italicum* (LISU236684), *S. impressa* (LISU233493) e *S. virgaurea* (LISU ).

### 1.2. Reagentes

O crescimento de *Streptotoccus mutans* e *Streptococcus sobrinus* foi realizado em meio BHI (*Brain Heart Infusion*) 37 g/L da Fluka®. Na pesquisa de actividade antioxidante utilizou-se 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) da Aldrich® e metanol obtido da Panreac®. Para o ensaio de pesquisa de actividade inibitória do enzima acetilcolinesterase utilizou-se acetilcolinesterase (AChE) tipo VI-S, extraído de enguia eléctrica contendo 349 U/mg sólido e 411 U/mg de proteína, 5,5'-Ditiobis(2-ácido nitrobenzóico) (DTNB ou reagente de Ellman), iodeto de acetiltiocolina (AChI) e tampão HEPES, obtidos da Sigma®. O reagente DTNB foi dissolvido em tampão HEPES 50 mM (pH 8,0) contendo NaCl (50 mM) e  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  (20mM), ambos comprados à Panreac®.

No estudo do metabolismo *in vitro* pela acção dos sucos gástrico e pancreático artificiais utilizou-se pepsina da Fluka® contendo 0,53 U/mg e pancreatina isolada de pâncreas de porco, da Sigma®. A solução de suco gástrico artificial foi preparada com NaCl (2 mg/mL) e Pepsina (3,2 mg/mL). O pH foi ajustado a 1,2 recorrendo a HCl 1 M (HCl) obtido de Riedel de Haen®. A solução de suco pancreático artificial consistiu em tampão fosfatos pH 8,0 e pancreatina (2,5mg/mL). Para o tampão fosfatos utilizou-se fosfato de sódio dibásico ( $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ ) e fosfato de sódio monobásico ( $NaH_2PO_4 \cdot 7H_2O$ ) da Merck®.

Na elaboração do gradiente linear utilizado na cromatografia em HPLC-DAD utilizou-se uma mistura de metanol obtido da Panreac® e ácido trifluoroacético (0,005% TFA) da Merk®. Os padrões utilizados para a identificação de compostos por HPLC-DAD luteína, ácido cafeíco, ácido clorogénico, ácido rosmarínico e rutina foram comprados à Sigma®.

A manutenção das linhagens celulares Caco-2 e HeLa foi realizada em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) e RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*), respectivamente, suplementados com 5% L-glutamina, 10% FBS (*Fetum Bovine Serum*) e 5% de antibiótico Pen-Strep (penicilina 100 U/mL e estreptomicina 100 U/mL) comprados à Lonza®, à excepção do FBS, obtido da Cambrex®. Para a tripsinização das células utilizou-se tripsina e PBS da Lonza®. As diluições dos extractos foram realizadas em HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*) e DMEM, também obtidos da Lonza®. Nos estudos de citotoxicidade foi utilizado brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-1-il]-2,5-difenil-tetrazólio (MTT) e dimetilsulfóxido (DMSO), ambos da Sigma®.

Para a preparação de amostras para os estudos morfo-anatómicos foram utilizados historesina básica (metacrilato de hidroxietilo), activador (dibenzilperóxido), polimerizador (sulfóxido de dimetilo) da Leica®, acetona, etanol, glutaraldeído, ácido periódico, azul de toluidina O e 2,4-dinitrofenilhidrazina, obtidos da Sigma, ácido acético da Fisher Scientific® e metabissulfito de sódio, pararosanilina (fucsina diamante) fosfato de sódio dibásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) e fosfato de sódio monobásico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), para o tampão de fosfatos, da Merck®.

Para a caracterização histoquímica dos secretados utilizou-se vermelho de sudão IV, tetróxido de ósmio,  $\alpha$ -naftol e cloridrato de dimetilparafenileno diamina (reagente de nadi), cloreto de ferro III, dicromato de potássio, sulfato de azul do nilo (em ácido sulfúrico 1%), vermelho de ruténio e cloreto de alumínio da Sigma®.

### 1.3. Linhas Celulares

As linhas celulares utilizadas foram HeLa (ATCC#CCL-2), uma linha celular derivada do epitélio do adenocarcinoma cervical e Caco-2 (ATCC#HTB-37), uma linha de células epiteliais do adenocarcinoma colo-rectal. As células HeLa e Caco-2 foram respectivamente cedidas pelo Professor Doutor Fernando Antunes e pelo Professor Doutor Carlos Farinha, do Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

## 1.4. Equipamento

A liofilização das amostras foi realizada num liofilizador Heto® *PowerDry* 3000. A termostatização de soluções foi realizada num banho térmico LAUDA® *Ecoline Staredition RE104*.

Utilizou-se uma balança Mettler Toledo ( $\pm 0,1$  mg) na pesagem dos reagentes sólidos. A agitação e *vortex* de soluções foram realizadas num agitador Heidolph® *REAX 2000*. As amostras foram centrifugadas em Mini Spin F45-12-11 da *Eppendorf*. Utilizou-se um medidor de pH WTW® *inoLab* na preparação de soluções que exigiam o controlo deste parâmetro.

As análises por HPLC (*High Precision Liquid Chromatography*) foram realizadas num aparelho *Thermo-Finnigan* (Waltham, MA) *Surveyor*® Modular LC System equipado com uma coluna RP-8 (5 $\mu$ m) *Lichrospher*® e software *Xcalibur*®. A detecção foi realizada entre 200 e 600 nm com um detector *Finnigan Surveyor PDA Plus Detector* do tipo DAD (*diode array detector*). Para determinação das massas moleculares de compostos utilizou-se um espectrómetro de massa do tipo *ion trap*, *LCQ-Duo* da Thermo Scientific®.

As leituras de absorvência foram realizadas num espectrofotómetro *M350 Double Beam UV-Vis Spectrophotometer*. As leituras de absorvência em microplacas foram efectuadas num espectrofotómetro multi-canal leitor de microplacas Tecan® *Sunrise*.

As condições de esterilidade/asepsia do trabalho foram garantidas por uma câmara de fluxo laminar Esco® *Class II Biohazard Safety Cabinet*. A incubação de amostras foi realizada numa estufa *Shel Lab CO<sub>2</sub> Series* da Sheldon Mfg.Inc®. A confluência celular foi verificada num microscópio óptico Motic® *AE21*.

Para a preparação das amostras para Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM) o material foi seco num *Critical Point Drier* (BIO-RAD Microscience Division®) e metalizado com ouro num evaporizador *Freeze Drier* (POLARON® *E5300*). As observações foram realizadas num microscópio electrónico de varrimento *JEOL JSM*®-*T220* equipado com uma máquina fotográfica *MAMIYA* 6x7. Para o estudo da anatomia das estruturas glandulares, foram obtidas secções histológicas de amostras incluídas em moldes de historesina com um micrótomo rotativo Leica® *RM 2155*. As observações das secções histológicas e de alguns testes histoquímicos foram realizadas em luz visível num microscópio Leica *DM 2500* com uma câmara digital *DFC 500* Leica®. Na observação de alguns testes histoquímicos utilizou-se também um microscópio de epifluorescência *LEITZ-SM-LUX*.

## 2. Procedimento Experimental

### 2.1. Preparação de Extractos Aquosos

Para a preparação das decocções de *H. italicum*, *S. impressa* e *S. virgaurea* foram utilizados 20 g de material vegetal fresco, previamente separado em caules/folhas e flores, cortado e colocado em 200 mL de água destilada em ebulição durante 10 minutos. Depois de arrefecidas as decocções foram filtradas em papel de filtro *Whatman* 1. Os extractos foram congelados e posteriormente liofilizados.

### 2.2. Determinação de Actividades Biológicas

#### 2.2.1. Determinação da Actividade Antibacteriana: Inibição do crescimento de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*

A actividade bacteriostática dos extractos aquosos foi determinada através do cálculo do valor MIC, conforme o procedimento descrito por Figueiredo *et al.* (2009). Utilizaram-se duas estirpes *Streptococcus mutans* (CETC 479) e *Streptococcus sobrinus* (CETC 4010).

As estirpes foram cultivadas em meio BHI, sob condições anaeróbicas, asseguradas pelo desarejamento com azoto. As culturas foram incubadas *overnight* numa estufa e a concentração foi ajustada a 0,5 UA (unidades de absorvência) a 630nm, correspondendo a  $1,5 \times 10^8$  ufc/mL. Em seguida tornou-se a ajustar a concentração das culturas para  $1,5 \times 10^6$  ufc/mL. Em placas estéreis de 96 poços foram adicionados 100 µL de suspensão bacteriana de cada estirpe e 100 µL de extracto aquoso de folhas de *H. italicum*, *S. virgaurea* e *S. impressa*. Para cada concentração de extracto foi realizado um branco, substituindo a suspensão bacteriana por meio BHI. Realizou-se também um ensaio controlo em que o extracto aquoso foi substituído por meio. Após um período de incubação de 48 horas a 37°C em condições anaeróbicas, o crescimento bacteriano foi estimado espectrofotometricamente a 630 nm.

#### 2.2.2. Determinação da Actividade Antioxidante

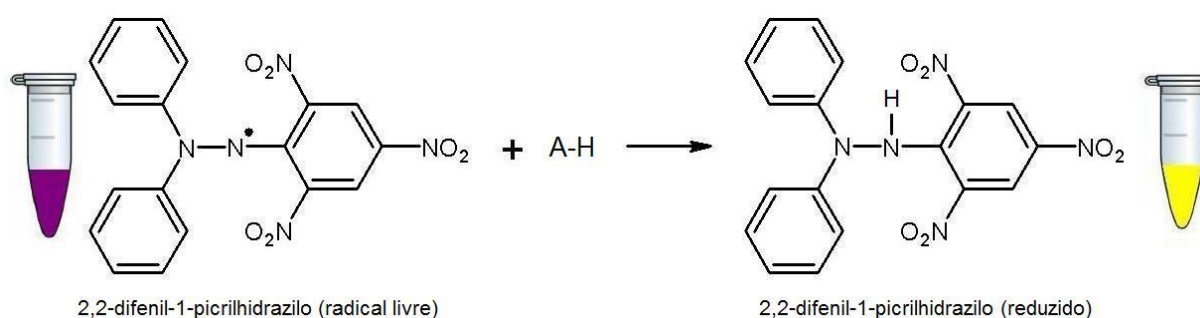
A actividade antioxidante do extracto foi determinada pelo método DPPH (Tepe *et al.*, 2005), com algumas modificações. Foram adicionados 25 µL de extracto aquoso, a 2,5 mL de solução metanólica de DPPH (0,002% em metanol). A mistura foi incubada durante 30 minutos à temperatura ambiente. Os valores de absorvência foram lidos a 517 nm contra um branco contendo metanol no lugar da solução metanólica de DPPH. Foi realizado ainda um ensaio controlo onde se substituiu a

solução de extracto por água destilada representando o DPPH a 100%. A actividade antioxidante foi calculada segundo a fórmula:

$$AA(\%) = 100 - 100 \times \left( \frac{A_{amostra}}{A_{controlo}} \right)$$

Sendo AA a actividade antioxidante;  $A_{amostra}$  e  $A_{controlo}$  correspondem às absorvências da amostra e do controlo, respectivamente.

Os ensaios foram realizados em triplicado para cada amostra, em diversas concentrações. Recorrendo à análise da regressão linear, a concentração de extracto correspondente a 50% de actividade antioxidante ( $EC_{50}$ ) foi obtida por interpolação gráfica da actividade antioxidante em função da concentração do extracto de planta.



**Figura 2** - Representação esquemática da redução do radical livre DPPH• na presença de uma substância com propriedades antioxidantes, capaz de doar um próton. O DPPH é reduzido perdendo a cor violeta intensa e adquirindo um tom amarelo característico do grupo picril.

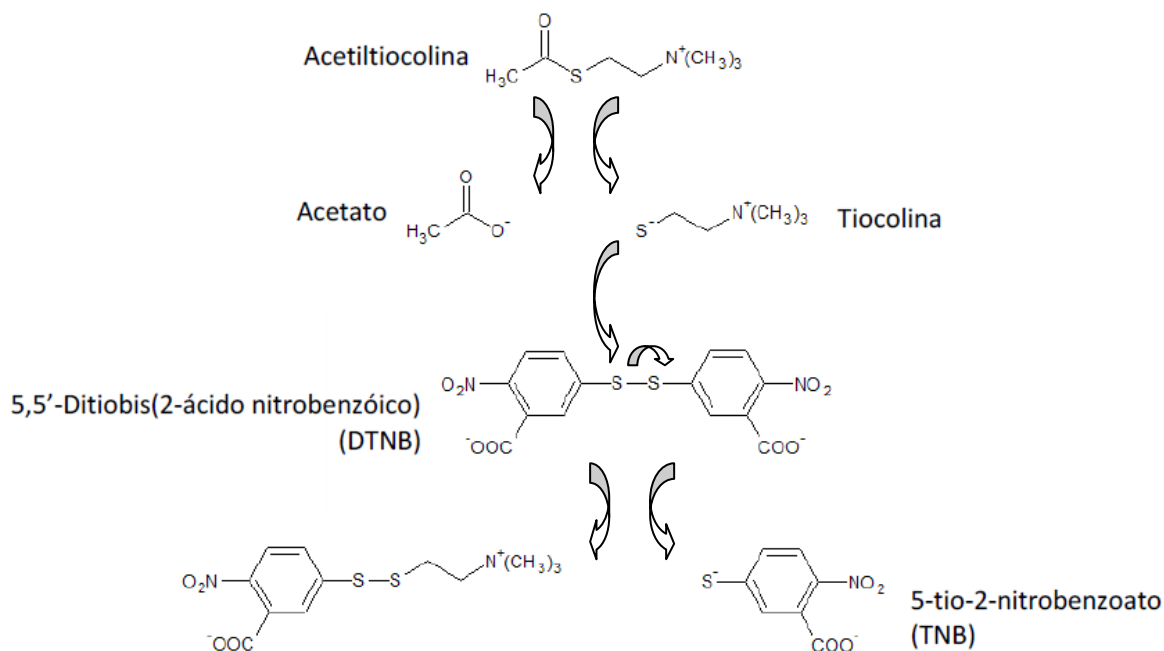
### 2.2.3. Determinação da Inibição da Actividade de Acetilcolinesterase

O estudo da inibição de acetilcolinesterase foi realizado segundo o método de Ellman descrito por Ingkaninan *et al.* (2003), com ligeiras modificações. Numa *cuvette* foram adicionados 325  $\mu$ L de solução tampão HEPES 50 mM (pH 8,0), 100  $\mu$ L de extracto e 2,5  $\mu$ L do enzima acetilcolinesterase. Incubou-se durante 15 minutos à temperatura ambiente, sendo em seguida adicionados 75  $\mu$ L de solução AChI (0,023 mg/mL) e 475  $\mu$ L de solução DTNB (3 mM). Os valores de absorvência foram lidos durante 5 minutos, em intervalos de 30 segundos, contra um branco em que se substituiu o mesmo volume de enzima por solução tampão HEPES 50 mM (pH 8,0). A velocidade inicial da reacção foi determinada graficamente. A reacção controlo foi realizada com água destilada no lugar de extracto, assumindo-se, neste caso, 100% de actividade. A percentagem de inibição do enzima foi calculada segundo a fórmula:

$$I (\%) = 100 - 100 \times \left( \frac{V_{amostra}}{V_{controlo}} \right)$$

Sendo  $I (\%)$  a percentagem de inibição do enzima AChE;  $V_{amostra}$  e  $V_{controlo}$  as velocidades iniciais da reacção contendo o extracto e da reacção controlo, respectivamente. O ensaio foi realizado em triplicado para cada concentração de amostra utilizada, de forma a calcular o valor de  $IC_{50}$ .

Nos casos em que a densidade óptica da solução é elevada ao ponto de não permitir a leitura no espectrofotómetro, foi substituído o tampão HEPES por tampão fosfato 50 mM pH 7,4.



**Figura 3** – Reacção química de Ellman usada para determinar a actividade anti-acetilcolinesterase. Adaptado de Frasco, Fournier, Carvalho & Guilhermino (2005).

### 2.3. Análise dos extractos por HPLC-DAD

Para a análise dos extractos vegetais por HPLC-DAD utilizou-se um gradiente de eluição composto por solução A (0,05% TFA em água MiliQ) e B (metanol) conforme o método: 0 minutos: 70% A e 30% B; 40 minutos: 30% A e 70% B; 45 minutos: 30% A e 70% B; 47 minutos: 70% A e 30% B; 50 minutos: 70% A e 30% B, num fluxo de 0,8 mL/minuto. O volume de injeção foi de 25  $\mu\text{L}$  de uma solução de extracto aquoso (1 mg/mL).

### 2.4. Identificação de compostos por Espectrometria de Massa (EM)

Para identificação dos compostos maioritários do extracto aquoso de folhas de *H. italicum* utilizou-se um espectrómetro de massa do tipo *ion trap* equipado com uma fonte de ionização por



*electrospray*. As fracções foram injectadas na bomba de seringa a uma velocidade constante de 5 µl/min. Ajustou-se o fluxo de gás nebulizador (azoto) para 40 (unidades arbitrárias), o fluxo de gás auxiliar (azoto) para 20 (unidades arbitrárias), a voltagem aplicada ao spray na fonte para 4.5 kV e a temperatura do capilar a 220°C. Os espectros de massa foram adquiridos no modo negativo numa gama de  $m/z$  100-1000, à excepção do espectro do composto posteriormente identificado como taxifolina-3-O-xilósido, adquirida em modo positivo. Na recolha das fracções do extracto por HPLC-DAD, substituiu-se o ácido trifluoroacético (0,05%) no gradiente de eluição por ácido fórmico (0,1%) de forma a obter uma melhor resolução no espectrómetro de massa.

## 2.5. Ensaios de Metabolismo *in vitro* dos Extractos Aquosos

### 2.5.1. Digestão por Suco Gástrico Artificial

O método de estudo do metabolismo *in vitro* pelo suco gástrico foi adaptado de Yamamoto *et al.* (1999). Foi adicionado igual volume de amostra do extracto em estudo, com concentração correspondente a  $IC_{50}$  e solução de suco gástrico artificial. A mistura foi incubada a 37°C durante 4 horas. Foram recolhidas amostras no instante inicial e ao final de cada hora. A paragem da reacção (pH 5,0) foi realizada adicionando NaOH (0,1 M) e metanol, para os casos de análise por HPLC e estudo das actividades antiacetilcolinesterase e antioxidante, respectivamente. As amostras foram centrifugadas a 5433 g durante 5 minutos. O sobrenadante foi recolhido para posterior análise por HPLC-DAD e estudo das actividades antioxidante e inibidora do enzima AChE, conforme descrito anteriormente. O ensaio foi realizado em triplicado e no ensaio controlo substituiu-se o extracto por igual volume de água destilada.

### 2.5.2. Digestão por Suco Pancreático Artificial

O estudo do metabolismo *in vitro* pelo suco pancreático foi realizado segundo o método descrito por Yamamoto *et al.* (1999), ligeiramente adaptado. Foi adicionado igual volume de amostra do extracto em estudo, com concentração correspondente a  $IC_{50}$  e solução de suco pancreático artificial. A mistura foi incubada a 37°C durante 4 horas. Foram recolhidas amostras no instante inicial e ao final de cada hora. A paragem da reacção (pH 3,0) foi realizada adicionando HCl (15%) e metanol, para os casos de análise por HPLC-DAD e estudo das actividades AChE e antioxidante, respectivamente. As amostras foram centrifugadas a 5433 g durante 5 minutos. O sobrenadante foi recolhido para posterior análise por HPLC-DAD e estudo das actividades antioxidante e inibidora do enzima acetilcolinesterase, conforme descrito anteriormente. O ensaio foi realizado em triplicado e no ensaio controlo substituiu-se o extracto por igual volume de água destilada.

### 2.5.3. Digestão por $\beta$ -glucuronidase de *Escherichia coli*

Preparou-se uma mistura reaccional a partir da adição de 200  $\mu$ L de extracto em estudo (2 mg/mL) a 200  $\mu$ L de  $\beta$ -glucuronidase de *E. coli* (2000 U/mL  $\beta$ -glucuronidase em tampão fosfatos de potássio 5mM, pH 7,4). Simultaneamente foram preparados dois ensaios controlo, um contendo 200  $\mu$ L de  $\beta$ -glucuronidase de *E. coli* (2000 U/mL  $\beta$ -glucuronidase em tampão fosfatos de potássio 5 mM, pH 7,4) e 200  $\mu$ L de água destilada e o outro contendo 200  $\mu$ L de extracto em estudo (2 mg/mL) e 200  $\mu$ L de tampão fosfatos de potássio 5 mM, pH 7,4). As soluções foram incubadas num banho termostatzado a 37°C durante duas horas. Em seguida centrifugaram-se as amostras a 5433 g durante 10 minutos. O sobrenadante foi analisado por HPLC-DAD.

## 2.6. Determinação da Citotoxicidade dos Extractos Aquosos

As células Caco-2 e HeLa foram cultivadas em caixas de Petri, em meio DMEM e RPMI, respectivamente, a uma temperatura de 37°C numa estufa contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Os meios de cultura foram suplementados com 10% FPS, 100 U/mL de penicilina, 100 U/mL de estreptomicina e 2 mM de L-glutamina (Kern *et al.*, 2003) e substituídos a cada 48-72 horas.

Após verificação ao microscópio óptico de 80-90% de confluência celular, removeu-se o meio e lavou-se a cultura com 3 mL de PBS (1:9 v/v). Em seguida adicionou-se 1 mL de tripsina para ajudar na separação das células e incubou-se durante 5 minutos a 37°C. No caso de células HeLa, procedeu-se à sua contagem num hemacitómetro. Foi adicionado meio RPMI de forma a obter uma concentração final de 50000 células/mL, ou seja, 5000 células por poço de microplacas de 96 poços. No caso das células Caco-2, as células foram ressuspensas em 20 mL de meio DMEM.

A citotoxicidade dos extractos foi analisada pelo método do MTT. As células de HeLa e Caco-2 (100  $\mu$ L) foram semeadas em microplacas de 96 poços com uma densidade de 5000 células por poço em meio RPMI e DMEM, respectivamente, até atingirem confluência. O meio foi substituído por 100  $\mu$ L de extracto em várias concentrações realizadas com RPMI ou HBSS, no caso de células HeLa e Caco-2, respectivamente. Após 6 horas de incubação a 37°C, a solução de extracto foi substituída por 100  $\mu$ L de solução MTT (5 mg/mL em meio de cultura) e incubou-se, nas mesmas condições, durante 2 horas. Por último a solução de MTT foi substituída por igual volume de DMSO. Após 1 hora foi lida a absorvência a 570 nm num leitor de microplacas. Os ensaios foram realizados em duplicado. A absorvência lida é proporcional ao número de células viáveis. O branco foi preparado com células crescidas em meio RPMI e HBSS, para células HeLa e Caco-2 respectivamente, sem adição de extracto.

## 2.7. Estudo da Permeação da Barreira Intestinal e Biodisponibilidade de Compostos

Foram semeadas células Caco-2 em placas *transwell* numa área de 0,9 cm<sup>2</sup>. No lado apical foram colocados 500 µL de suspensão celular e no lado baso-lateral foi colocado 1 mL de meio DMEM.

Ao fim de 4 semanas, quando foi atingida confluência celular, removeu-se o meio DMEM e adicionou-se HBSS de forma realizar uma lavagem das células e remover todo o meio de cultura. No lado apical, o HBSS foi substituído por 500 µL de solução HBSS com extracto numa concentração não tóxica. No lado baso-lateral foram colocados 1,5 mL de HBSS e incubou-se durante 6 horas a 37°C. Em seguida recolheram-se as amostras do lado apical e baso-lateral para análise em HPLC-DAD. Adicionou-se 1 mL de HBSS para ressuspender as células do filtro e centrifugou-se a 5433 g durante 10 minutos. O sobrenadante foi recolhido e analisado por HPLC-DAD, juntamente com as restantes amostras.

Os ensaios foram efectuados em triplicado. O ensaio controlo foi realizado utilizando solução de HBSS sem extracto vegetal, no lado apical.

## 2.8. Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM)

Para o estudo da morfologia e distribuição das estruturas secretoras nos diferentes órgãos, folhas e flores de *H. italicum*, *S. impressa* e *S. virgaurea* em diferentes estádios de desenvolvimento foram fixadas em glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 7,2), durante 72 horas a 4°C. Em seguida o material foi lavado no tampão do fixador e desidratado numa série crescente de etanol (30%-90%, 15 minutos em cada uma das concentrações) e 1 hora em etanol absoluto (3x20 minutos). Posteriormente, o material foi transferido para uma solução de etanol/acetona (v/v) durante 1 hora (3x20 minutos) e em seguida para acetona absoluta (3x20 minutos), onde se mantiveram até serem secas pelo método do ponto crítico do CO<sub>2</sub>. As amostras secas foram ulteriormente montadas em porta-objectos, metalizadas com ouro e observadas num microscópio electrónico de varrimento JEOL T-220 a 20KV. As imagens foram registadas em filme a preto e branco KODAK® Tmax 100 pro.

## 2.9. Microscopia óptica (MO)

### 2.9.1. Anatomia e Histoquímica em Material Fixado

As estruturas secretoras das três espécies de Asteraceae foram estudadas em secções de material fixado e incluído em historesina. O processo de fixação foi realizado conforme descrito na secção 2.8. Após a desidratação em etanol, as amostras foram colocadas a 4°C em diferentes misturas de pré-infiltração (etanol/mistura de infiltração) nas proporções de 3:1, 1:1 e 1:3 (v/v) durante 24 horas cada. Em seguida as amostras passaram para uma mistura de infiltração pura constituída por historesina básica (metacrilato de hidroxietilo) com activador (dibenzilperóxido) a 1%. A inclusão das amostras em moldes de historesina foi realizada em mistura de infiltração à qual foi adicionado o polimerizador (sulfóxido de dimetilo) numa proporção de 15:1 (v/v). A polimerização ocorreu sobre a placa de aquecimento a 60°C durante 48 horas.

Secções (transversais e longitudinais) das amostras, com 2-5 µm de espessura, foram realizadas com um micrótomo rotativo equipado com faca de tungsténio. As secções obtidas foram montadas em lâminas de vidro e coradas sequencialmente com ácido periódico/Reagente de Schiff<sup>1</sup> (PAS) e Azul de Toluidina O para detecção de polissacáridos. As lâminas foram imersas durante 10 minutos numa solução saturada de 2,4-dinitrofenilhidrazina em ácido acético a 15%, sendo posteriormente lavado em água corrente (15 minutos) e secas em estufa a 60°C (15 minutos). Em seguida as lâminas foram tratadas com Ácido Periódico 1% (10 minutos), lavadas em água corrente (5 minutos) e secas em estufa a 60°C (15 minutos). Após coloração com Reagente de Schiff (30 minutos), as lâminas foram lavadas primeiro com metabissulfito de sódio a 0,5% em ácido clorídrico 0,05 N (3x2 min) e depois com água corrente (5 minutos), sendo secas à temperatura ambiente. A esta coloração seguiu-se uma segunda coloração em Azul de Toluidina O (2 minutos), lavagem e secagem novamente à temperatura ambiente.

### 2.9.2. Histoquímica em Material Fresco

Secções transversais de caules/folhas de *H. italicum*, *S. impressa* e *S. virgaurea* foram realizadas à mão livre e submetidas a vários testes histoquímicos para detecção dos principais grupos químicos que constituem os seus secretados. Utilizou-se Vermelho de Sudão IV para detecção de lípidos totais, Sulfato de Azul do Nilo para distinguir lípidos ácidos de neutros, Tetróxido de Ósmio para caracterizar lípidos insaturados, Reagente de Nadi para revelar terpenóides (distinguir óleos

---

<sup>1</sup> O Reagente de Schiff foi preparado misturando uma solução de 2 g de fucsina diamante em 60 mL HCl 1N com uma solução de 2 g de metabissulfito de sódio em 3000 mL de água destilada. Deixou-se repousar durante 24 horas. Adicionou-se 1,2 g de carvão activado e agitou-se durante 2 minutos. Filtrou-se e manteve-se o no escuro a 4°C.

essenciais de resinas), Cloreto de Ferro III e Dicromato de Potássio para evidenciar compostos fenólicos e Vermelho de Ruténio para detectar pectinas e mucilagens vegetais. Os compostos fenólicos foram também caracterizados *in situ* por incidência de Luz Azul e UV e os flavonóides foram detectados por indução de fluorescência com Cloreto de Alumínio (Charrière-Ladreix, 1973). As observações foram realizadas num microscópio de epifluorescência equipado com bloco de filtros A (filtro de excitação BP 340-380 nm, espelho dicróico 450 e filtro de paragem LP-430) e um bloco de filtros I<sub>2</sub> (filtro de excitação 450-490 nm, espelho dicróico 450 e filtro de paragem LP-515). As imagens foram registadas em filme positivo a cores KODAK® *Provia 400 ASA*.



## IV. Resultados e Discussão

---





## 1. Determinação de Actividades Biológicas em Extractos Aquosos de *Helichrysum italicum*, *Santolina impressa* e *Solidago virgaurea*

Um dos objectivos deste trabalho consistiu na determinação das actividades antibacteriana, antioxidante e inibitória do enzima AChE de extractos aquosos de *Helichrysum italicum*, *Santolina impressa* e *Solidago virgaurea*.

### 1.1. Actividade Antibacteriana: Inibição do Crescimento de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*

Com o objectivo de investigar se os extractos aquosos das espécies em estudo possuem actividade antibacteriana foi estudada a inibição do crescimento *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*, estirpes Gram-positivas responsáveis pelo aparecimento de cáries dentárias e pela produção e desenvolvimento da placa bacteriana.

O ensaio de inibição do crescimento de *S. mutans* e *S. sobrinus* tem como objectivo determinar os valores de MIC (concentração mínima inibitória) e IC<sub>50</sub> correspondente à concentração de extracto responsável por 50% de inibição do crescimento bacteriano (Tabela 1). A MIC foi considerada como a concentração que provoca 90% de inibição do crescimento bacteriano. O crescimento das culturas foi seguido pela medição da densidade óptica.

**Tabela 1** - Concentração mínima de inibição (MIC) e IC<sub>50</sub> de extractos aquosos de *Helichrysum italicum*, *Santolina impressa* e *Solidago virgaurea* para *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*. Valores expressos em mg/mL ± desvio padrão de 3 replicados.

Extractos		<i>Streptococcus mutans</i>		<i>Streptococcus sobrinus</i>	
		MIC	IC <sub>50</sub>	MIC	IC <sub>50</sub>
<i>Helichrysum italicum</i>	Folhas	0,039 ± 0,0047	0,0097 ± 0,0062	0,056 ± 0,031	0,022 ± 0,024
<i>Santolina impressa</i>	Folhas	1,63 ± 0,39	0,46 ± 0,063	1,41 ± 0,080	0,44 ± 0,14
<i>Solidago virgaurea</i>	Folhas	1,62 ± 0,23	0,71 ± 0,18	-----	-----

O extracto aquoso de folhas de *H. italicum* apresenta os melhores valores de MIC e IC<sub>50</sub> para ambas as estirpes. Não foi possível determinar os valores de MIC e IC<sub>50</sub> para o extracto aquoso de *S. virgaurea* contra *S. sobrinus* por não se ter conseguido cultivar de novo a estirpe bacteriana. No

entanto, o esperado é que sejam na mesma ordem de grandeza dos valores obtidos para *S. mutans*, como verificado para as outras duas espécies.

Na literatura existem algumas referências a valores de MIC para extractos aquosos e orgânicos de várias espécies vegetais. Em relação a espécies Asteraceae, Nostro *et al.* (2004) obtiveram um valor de MIC para *S. mutans* de 0,0625 mg/mL para extractos etanólicos de flores de *H. italicum*. Nos estudos realizados por Freires *et al.* (2010) com extractos etanólicos de partes aéreas de *Solidago microglossa*, foi determinado um MIC para *S. mutans* de 7,810 mg/mL. Também Khadri *et al.* (2009) determinaram o valor de MIC para extractos aquosos de *Cymbopogon shoenanthus* (Poeaceae), tendo obtido  $32 \pm 3$  mg/mL para *S. mutans* e  $32 \pm 3$  para *S. sobrinus*. Recentemente Figueiredo *et al.* (2010) determinaram o MIC para duas espécies Lamiaceae, *Plectranthus barbatus* e *Plectranthus ecklonii*, tendo sido obtidos valores de  $2,9 \pm 0,1$  mg/mL e  $5,0 \pm 0,0$  mg/mL para *S. mutans* e  $3,8 \pm 0,0$  mg/mL e  $4,7 \pm 0,3$  mg/mL para *S. sobrinus*, respectivamente.

Ao comparar os valores de MIC obtidos pelos diversos autores com os valores determinados neste trabalho, verifica-se que os extractos aquosos de *H. italicum*, *S. impressa* e *S. virgaurea* apresentam uma elevada actividade inibitória do crescimento de *S. mutans* e *S. sobrinus*. Todos os valores de MIC determinados são inferiores aos descritos na literatura. Em geral, extractos orgânicos apresentam melhores valores de actividade quando comparados com decocções (Palombo, 2009), embora neste estudo os valores de MIC do extracto aquoso de folhas de *H. italicum*, para as duas estirpes, tenham sido inferiores aos referidos anteriormente para a mesma espécie (Nostro *et al.*, 2004) assim como o verificado para *Solidago microglossa* em relação a *S. virgaurea*, neste caso tratando-se de espécies diferentes. Os valores de MIC obtidos nos dois estudos de *H. italicum* podem ser devidos ao facto de se tratarem de subespécies provavelmente diferentes, no presente estudo *H. italicum* spp. *picardii* sendo desconhecida a subespécie do trabalho realizado anteriormente por Nostro *et al.* (2004).

Os valores de MIC fornecem indirectamente alguma informação respeitante à formação de biofilme bacteriano. Uma vez que para as concentrações de MIC determinadas para os extractos aquosos das três espécies o crescimento bacteriano foi inibido, não é também esperada a formação de biofilme.

Os “chás” são de um modo geral uma das melhores fontes de flavonóides, classe de compostos a que tem sido atribuída a actividade inibitória de diversos patogéneos, como por exemplo bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e vírus (Bylka, Matlawska & Pilewski, 2004). O *screening* de espécies vegetais para pesquisa de agentes antimicrobianos é uma abordagem importante reconhecida como válida para a identificação de compostos naturais com propriedades antibacterianas contra patogéneos dentários (Tichy & Novak, 2008).

## 1.2. Actividade Antioxidante

Neste estudo foi avaliada a actividade antioxidante de extractos aquosos de *H. italicum*, *S. impressa* e *S. virgaurea* através do método do radical livre DPPH. A capacidade de redução de radicais livres DPPH<sup>•</sup> (%) foi determinada pela diminuição na sua absorvência, induzida pelos antioxidantes presentes na amostra. Este modelo de avaliação é baseado na capacidade do radical livre reagir com substâncias doadoras de H ( $\text{DPPH}^{\bullet} + [\text{AH}]_n \rightarrow \text{DPPH-H} + [\text{A}^{\bullet}]_n$ ). A formação e acumulação de radicais livres leva à ocorrência de stress oxidativo. Este stress pode ocorrer em consequência de várias condições clínicas como doenças neurodegenerativas, como por exemplo a Doença de Alzheimer e doenças do tracto gastrointestinal (Aruoma, 1998; Bilušić *et al.*, 2008; Spencer, 2008). O cérebro é particularmente vulnerável aos processos oxidativos e, em comparação com outros tecidos, é menos eficiente na eliminação de radicais livres (Steel *et al.*, 2007).

A actividade antioxidante foi determinada através do valor de EC<sub>50</sub>, valor correspondente à concentração necessária para provocar 50% de extinção *in vitro* de radicais livres DPPH<sup>•</sup> (Tabela 2). Verifica-se um comportamento linear entre a percentagem de extinção do radical livre DPPH e a concentração de extracto aquoso testada (Anexo A). Quanto maior a concentração de extracto, maior a percentagem de extinção do radical livre. Observando a Tabela 2 verifica-se que o extracto aquoso das flores de *H. italicum* apresenta o menor valor de EC<sub>50</sub> de 10,14 ± 0,02 µg/mL correspondendo assim a um maior consumo do radical DPPH, devido à existência de compostos no extracto com elevada capacidade antioxidante. Contudo, o extracto aquoso de folhas da mesma espécie apresenta o maior valor de EC<sub>50</sub> (14,95 ± 0,30 µg/mL). Os extractos aquosos das três espécies em estudo têm actividades antioxidantes bastante semelhantes.

**Tabela 2** - Actividade antioxidante expressa em concentração eficiente (EC<sub>50</sub>) determinada pelo método DPPH e capacidade inibitória do enzima acetilcolinesterase (IC<sub>50</sub>) para extractos aquosos de partes aéreas (caules/folhas, flores) de *Helichrysum italicum*, *Santolina impressa* e *Solidago virgaurea*. Valores de EC<sub>50</sub> e IC<sub>50</sub> expressos em µg/mL ± d.p. de 3 replicados.

Extracto		Actividade antioxidante (EC <sub>50</sub> )	Inibição de acetilcolinesterase (IC <sub>50</sub> )
<i>Helichrysum italicum</i>	Folhas	14,95 ± 0,30	423,52 ± 6,04
	Flores	10,14 ± 0,02	302,52 ± 1,14
<i>Santolina impressa</i>	Folhas	12,86 ± 0,07	578,98 ± 13,70
	Flores	14,70 ± 0,06	328,33 ± 3,33
<i>Solidago virgaurea</i>	Folhas	10,69 ± 0,31	551,96 ± 7,42
	Flores	11,67 ± 0,28	329,69 ± 14,29

Para chegar a uma conclusão acerca da capacidade antioxidante dos extractos aquosos em estudo é necessário comparar os valores de EC<sub>50</sub> obtidos com outros valores determinados para

diferentes espécies do mesmo género. Em estudos anteriores de determinação da actividade antioxidante em extractos de *Helichrysum*, verificou-se que em extractos metanólicos de quatro espécies turcas o melhor valor de EC<sub>50</sub> foi o revelado por *H. chinophilum*, EC<sub>50</sub> 40,5 µg/mL (Tepe *et al.*, 2005). Também recentemente Albayrak, Aksoy, Sagdic & Hamzaoglu (2010) determinaram o EC<sub>50</sub> de dezasseis extractos metanólicos de espécies de *Helichrysum* tendo obtido valores entre 7,95-53,10 µg/mL, respectivamente para *Helichrysum stoechas* e *Helichrysum chionophilum*). Os valores obtidos neste trabalho são semelhantes, na mesma ordem de grandeza aos obtidos por Albayrak *et al.* (2010), o que indica que os extractos aquosos de *H. italicum* possuem uma boa actividade antioxidante. No entanto estes autores estudaram extractos metanólicos o que poderá ter permitido uma extracção mais eficiente de compostos não solúveis em água.

Muito recentemente em extractos metanólicos de *Santolina rosmarinifolia* foi determinado um EC<sub>50</sub> de 85,77 µg/mL (Nikolova, Evstatieva & Nguyen, 2011), valor que é muito elevado comparativamente aos obtidos neste trabalho nos extractos aquosos de *S. impressa*.

Para *S. virgaurea* existe na literatura uma comparação entre valores de EC<sub>50</sub> obtidos com extractos metanólicos e aquosos, sendo que para uma concentração de 25 µg/mL foram obtidas actividades redutoras do radical DPPH de 12,27 e 4,72%, respectivamente (Demir *et al.*, 2009). Este valor de actividade é inferior ao obtido com o extracto aquoso em estudo.

Existem alguns estudos realizados com extractos aquosos de plantas. Em 2009 num estudo realizado em quinze espécies da família Asteraceae, foram obtidos em extractos aquosos valores de EC<sub>50</sub> compreendidos entre 198,0 ± 3,5 µg/mL e 2009,7 ± 84,2 µg/mL (Borneo, León, Aguirre, Ribotta & Cantero, 2009). Por comparação com os valores de EC<sub>50</sub> da literatura para extractos aquosos de Asteraceae, os valores de EC<sub>50</sub> obtidos para os extractos aquosos de *H. italicum*, *S. impressa* e *S. virgaurea* referidos são bastante baixos sugerindo uma actividade antioxidante elevada. Todos os valores de EC<sub>50</sub> são inferiores ao valor obtido para o padrão BHT (di-terc-butil-metil-fenol) 15,7 ± 0,2 µg/mL (Mata *et al.*, 2007), o que indica que os extractos aquosos em estudo possuem uma actividade antioxidante superior à do antioxidante usado na indústria alimentar (Albayrak *et al.*, 2010).

### 1.3. Actividade Inibitória de Acetilcolinesterase

Os extractos aquosos de *H. italicum*, *S. impressa* e *S. virgaurea* foram também avaliados em relação à capacidade inibitória do enzima acetilcolinesterase através do método colorimétrico modificado de Ellman (Tabela 2). Este método é baseado na medida da velocidade de produção de tiocolina através da hidrólise do análogo do substrato da AChE, a acetiltiocolina (análogo de AChE).

Para cada um dos extractos aquosos foi determinado o valor de  $IC_{50}$ , correspondendo à concentração de extracto que inibe 50% da actividade enzimática. À semelhança do verificado para a actividade antioxidante, também o extracto aquoso das flores de *H. italicum* apresenta o melhor valor de  $IC_{50}$  ( $302,52 \pm 1,14 \mu\text{g/mL}$ ). Ao valor de  $IC_{50}$  mais elevado, corresponde uma menor actividade inibitória do enzima, deste modo o extracto aquoso dos órgãos vegetativos de *S. impressa* ( $578,98 \pm 13,70 \mu\text{g/mL}$ ) é o que apresenta uma actividade menor. Verifica-se ainda que quanto maior a concentração de extracto aquoso, maior a percentagem de inibição de AChE (Anexo B). Os extractos das flores das três espécies em estudo apresentam valores de  $IC_{50}$  bastante semelhantes e superiores aos valores obtidos com os extractos de caules/folhas.

A maioria dos estudos publicados sobre a capacidade inibitória de AChE por plantas foi efectuada recorrendo a extractos metanólicos ou etanólicos cuja actividade inibitória tende a ser superior quando comparada com extractos aquosos (Carpinela, Andrione, Ruiz & Palacios 2010; Vinutha *et al.*, 2007). No estudo de Mata *et al.* (2007) citado anteriormente, os valores de  $IC_{50}$  para os cinco extractos aquosos das espécies da flora aromática portuguesa referidas na Secção 1.2 estão compreendidos entre  $91,7 \pm 0,7 \mu\text{g/mL}$  e  $774 \pm 0,5 \mu\text{g/mL}$ . Estes valores de  $IC_{50}$  são semelhantes e da mesma ordem de grandeza aos obtidos para os extractos aquosos das espécies em estudo (*H. italicum*, *S. impressa* e *S. virgaurea*). No estudo realizado por Hernandez *et al.* (2010) com várias espécies de *Hypericum* foram determinados valores de  $IC_{50}$  compreendidos entre  $0,62 \pm 0,06 \mu\text{g/mL}$  e  $1,79 \pm 0,37 \text{ mg/mL}$ .

A galantamina, o alcalóide mais usado no tratamento da doença de Alzheimer ao nível da inibição do enzima acetilcolinesterase (Matharu *et al.*, 2009), é um composto que apresenta um  $IC_{50}$  de  $0,21 \pm 0,02 \mu\text{g/mL}$  (Hernandez *et al.*, 2010). Este valor é inferior aos valores obtidos para os diferentes extractos aquosos em estudo, o que não é de admirar visto tratar-se de um composto com elevado grau de pureza. Os extractos aquosos em estudo são uma mistura de compostos, em que alguns dos constituintes podem uma actividade anti-AChE muito baixa ou mesmo nula. Para uma melhor avaliação do poder inibitório dos extractos seria necessário o isolamento dos compostos que os constituem e o estudo posterior da actividade inibitória do enzima AChE. Existem estudos que defendem a existência de uma correlação entre a acumulação de radicais livres e consequente stress oxidativo e as doenças neurodegenerativas, como a Doença de Alzheimer (Bilušić *et al.*, 2008; Spencer, 2008). Em termos de actividade antioxidante, o valor de  $EC_{50}$  da galantamina é  $>40 \mu\text{g/mL}$  (Hernandez *et al.*, 2010), muito superior aos valores obtidos com os extractos.

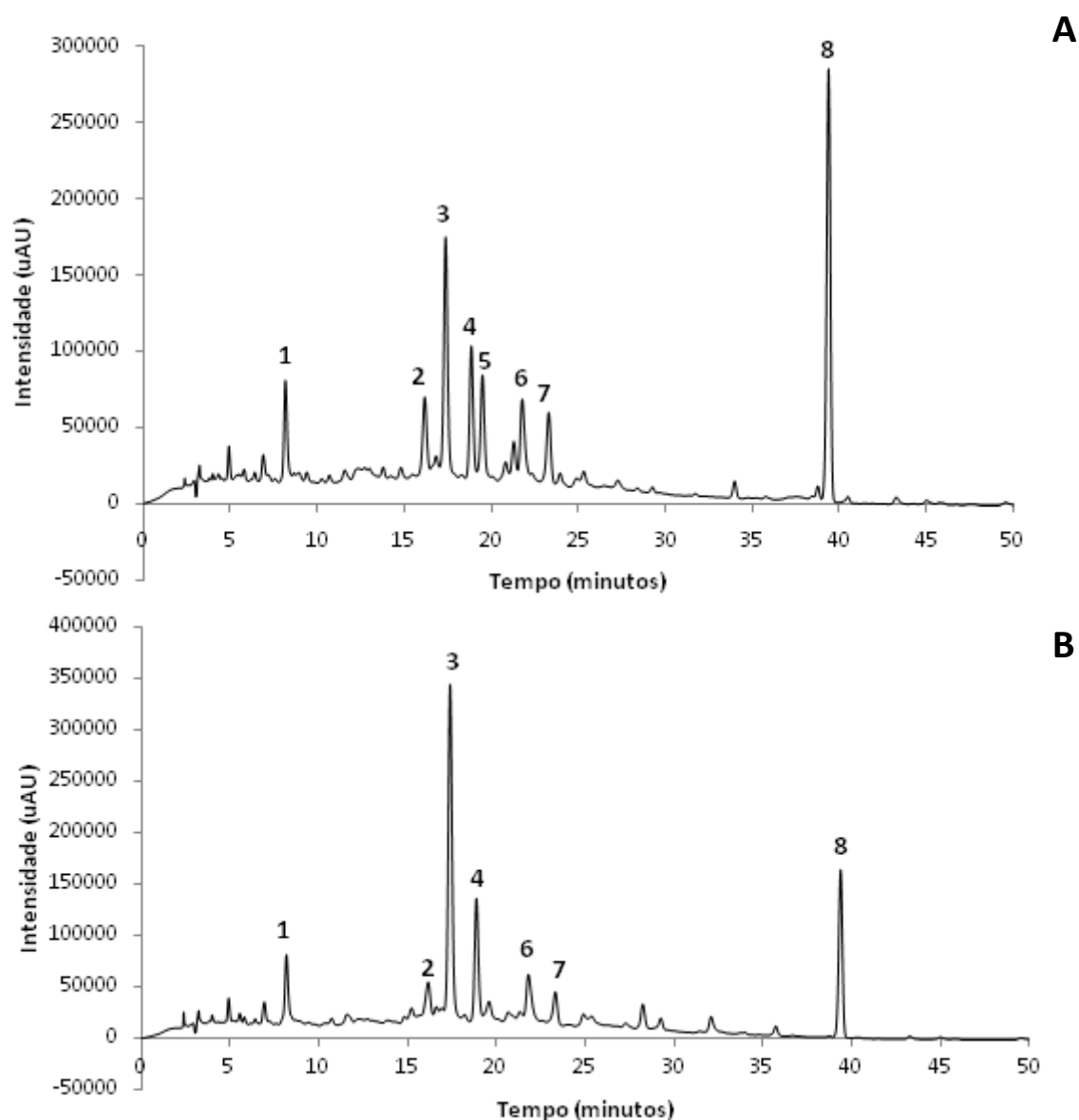
## 2. Identificação dos constituintes maioritários dos extractos aquosos de *Helichrysum italicum*, *Santolina impressa* e *Solidago virgaurea*.

Para a identificação dos compostos maioritários dos extractos aquosos das três espécies de Asteraceae em estudo utilizou-se cromatografia líquida com detecção por diodos (HPLC-DAD), permitindo a análise simultânea de vários compostos. Esta identificação preliminar é baseada no tempo de retenção dos compostos e no seu espectro de absorção UV-visível, comparativamente a padrões cromatografados sob as mesmas condições. No caso do *H. italicum*, sendo o extracto aquoso com maior actividade biológica, alguns dos compostos após separação por HPLC-DAD e recolha no final do processo foram identificados por espectrometria de massa.

### 2.1. *Helichrysum italicum*

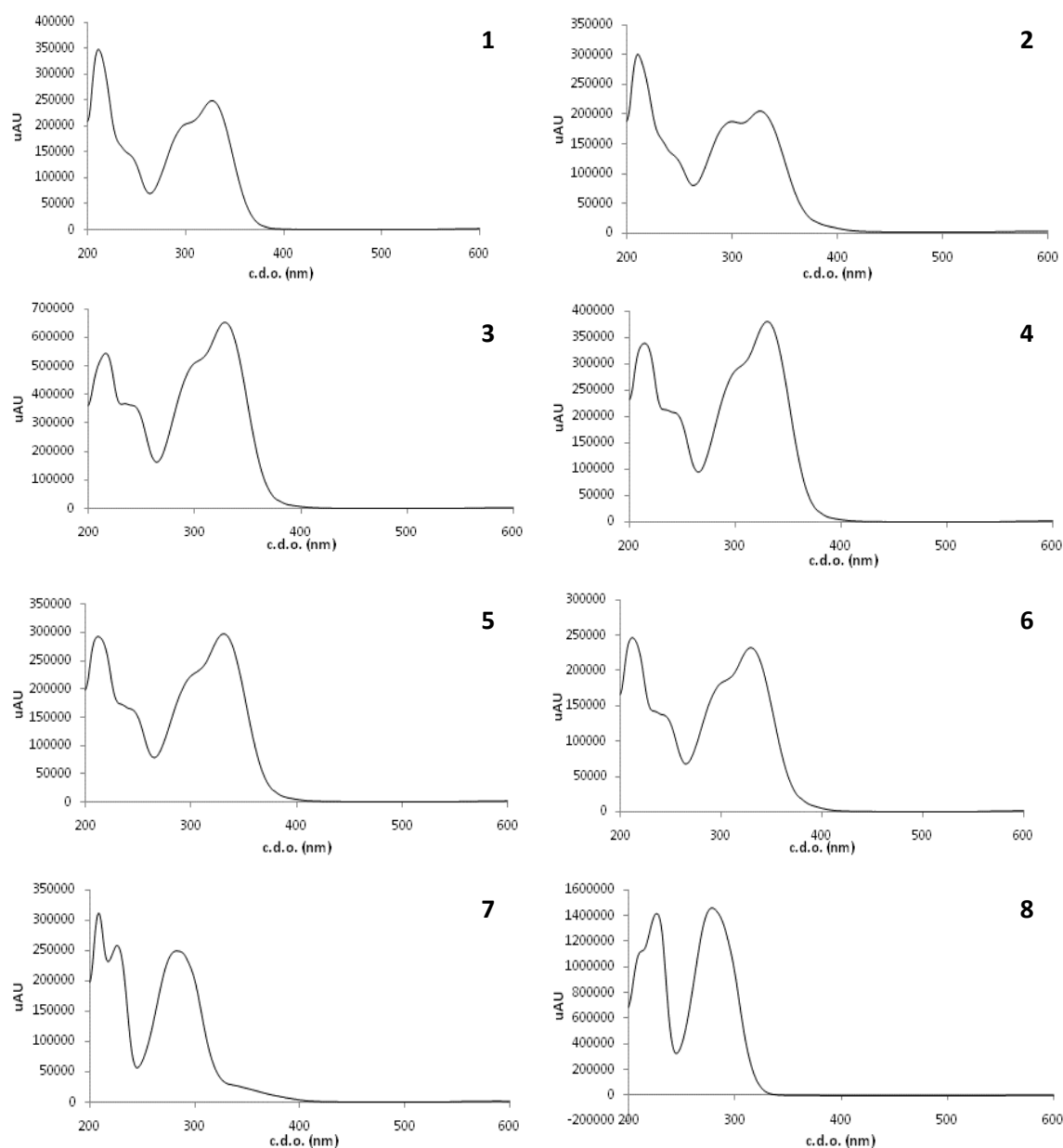
Os cromatogramas de HPLC-DAD para os extractos aquosos de caules/folhas e flores de *H. italicum* encontram-se representados nas Figuras 4A e 4B, respectivamente. No extracto aquoso de caules/folhas de *H. italicum*, foi possível detectar oito picos maioritários com os seguintes tempos de retenção (Tr): 8,14 min, 16,15 min, 17,35 min, 18,83 min, 19,47 min, 21,76 min, 23,28 min e 39,37 min (Figura 4A). No extracto aquoso de flores de *H. italicum* foi possível detectar sete picos maioritários, com os Tr de: 8,15 min, 16,14 min, 17,38 min, 18,86 min, 21,79 min, 23,31 min e 39,40 min (Figura 4B). Comparando o Tr dos picos maioritários de ambos os extractos aquosos verifica-se que são bastante semelhantes. Optou-se por numerar os picos da Figura 4 de modo a facilitar a comparação entre os extractos, daí que na Figura 4B não foi detectado o pico 5 presente apenas no extracto de caules/folhas do extracto.

Dada a semelhança entre os extractos de flores e folhas de *H. italicum*, foram identificados os picos maioritários do extracto de caules/folhas, visto ser o cromatograma com maior número de picos detectados por HPLC-DAD. Os espectros de absorção UV-Visível para cada um dos picos maioritários do extracto aquoso de caules/folhas *H. italicum*, encontram-se representados na Figura 5. Os espectros de absorção UV-Visível para os picos maioritários do extracto aquoso de flores de *H. italicum* (Anexo C) apresentam uma grande semelhança com os espectros obtidos para o extracto aquoso de caules/folhas, sugerindo composições químicas semelhantes, à excepção do composto referente ao pico 7, de cada extracto.



**Figura 4** - Cromatograma de HPLC-DAD de extracto aquoso de caules/folhas (A) e flores (B) de *Helichrysum italicum* (1mg/mL). Os picos maioritários encontram-se marcados de 1 a 8.

De acordo com os espectros da Figura 5 verifica-se uma semelhança entre os picos 1 e 2, verificando-se o mesmo para os picos 3-6. Estas semelhanças entre os espectros apresentados poderão indicar a presença de um composto derivado de uma estrutura comum. Os picos 7 e 8, por outro lado, apresentam espectros bastante distintos. A identificação dos compostos presentes nos extractos aquosos das três espécies realizou-se por espectrometria de massa e por HPLC-DAD por comparação com os espectros de absorção UV-Visível e Tr dos padrões: ácido cafeico, ácido clorogénico, ácido rosmarinico, rutina e luteolina em HPLC-DAD, com o mesmo sistema de eluição (Anexo D). A presença de ácido clorogénico foi identificada por comparação com o espectro de absorção UV-Visível e Tr do seu padrão injectado em HPLC-DAD. Os picos 1-6 foram identificados como compostos derivados do ácido caféico, uma vez que apresentam o espectro típico destes compostos em HPLC-DAD.



**Figura 5** - Espectros de absorção UV-Visível obtidos por HPLC-DAD para os oito picos maioritários do extracto aquoso de caules/folhas de *Helichrysum italicum* (1mg/mL): 1 (Tr = 8,14 min), 2 (Tr = 16,15 min), 3 (Tr = 17,35 min), 4 (Tr = 18,83 min), 5 (Tr = 19,47 min), 6 (Tr = 21,76 min), 7 (Tr = 23,28 min) e 8 (Tr = 39,37 min).

Para a identificação dos compostos por espectrometria de massa, isolaram-se os picos por HPLC-DAD, identificando a sua razão massa/carga ( $m/z$ ). No anexo E encontram-se representados os espectros de massa obtidos para os picos 2-3 e 6-8 e respectivos padrões de fragmentação. Através da análise dos espectros em modo negativo e positivo, foram determinadas as razões  $m/z$  experimentais e calculado o erro associado (ppm) em relação à razão  $m/z$  teórica. Estes valores encontram-se resumidos na Tabela 3. Nos espectros de massa dos compostos glicosilados verifica-se uma perda de massa de 162, atribuída à molécula de glucose (Anexo E).



**Tabela 3** – Iões detectados e respectivos erros (ppm) para as fracções colhidas dos picos 2,3,6-8.

Pico	Composição	m/z		Erro (ppm)
		Experimental	Teórica	
2	C <sub>25</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub> -H <sup>+</sup>	514,99353	515,126776	-258,17
3	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub> -H <sup>+</sup>	463,06824	463,095476	-58,69
6	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub> -H <sup>+</sup>	447,07996	447,100561	-45,97
7	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub> -H <sup>+</sup>	431,18939	431,105647	193,80
8	C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub> +H <sup>+</sup>	437,14313	437,100561	97,61

Na Tabela 4 encontram-se resumidos os compostos identificados para os oito picos maioritários do extracto aquoso de caules/folhas de *H. italicum*. Foi confirmada por espectrometria de massa a presença de ácido clorogénico (Pico 1) e foram ainda identificados os seguintes derivados de ácido cafeico: 3,4-ácido dicafeoilquínico (pico 2), quercetina-4-O-glucósido (pico 3), canferol-3-glucósido (pico 6), apigenina-7-O-glucósido (pico 7) e taxifolina-3-O-xilósido (pico 8). Os valores de MIC registados na Secção 1.1 podem estar relacionados com a presença de taxifolina, um composto já descrito na literatura como responsável pela actividade antibacteriana de extractos etanólicos de *Koompassia malaccensis* (Leguminosae), contra *S. sobrinus* (Kuspradini, Mitsunaga & Ohashi, 2009).

**Tabela 4** - Identificação dos picos maioritários do cromatograma de HPLC-DAD do extracto aquoso de caules/folhas de *Helichrysum italicum*. \* Sujeito a confirmação.

Pico	Tr (min)	Composto
1	8,14	Ácido clorogénico
2	16,15	3,4-Ácido dicafeoilquínico
3	17,35	Quercetina-4-O-glucósido*
4	18,83	Estrutura química semelhante a ácido cafeico
5	19,47	Estrutura química semelhante a ácido cafeico
6	21,76	Canferol-3-O-glucósido
7	23,28	Apigenina-7-O-glucósido
8	39,37	Taxifolina-3-O-xilósido*

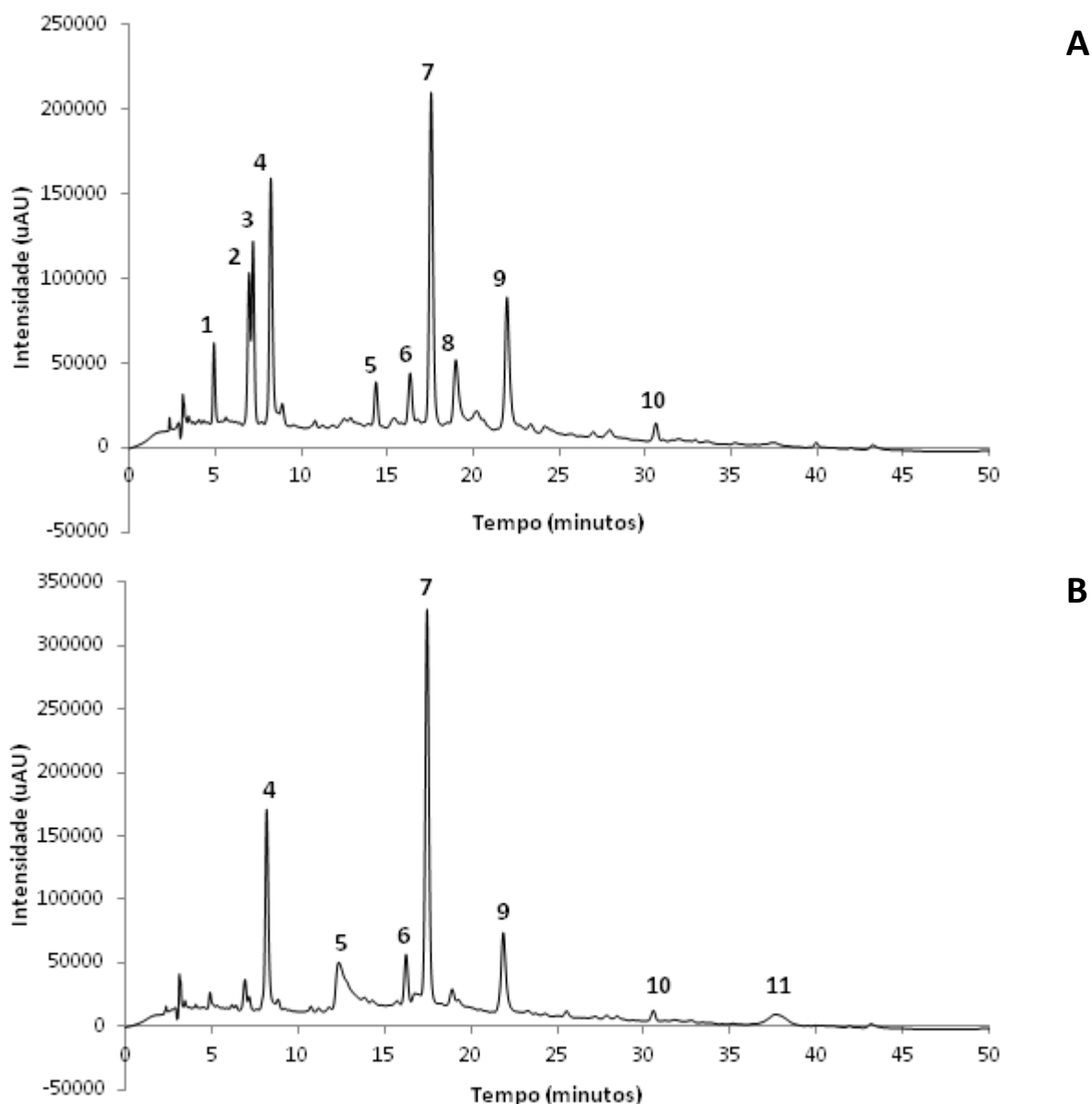
Alguns dos compostos identificados no extracto aquoso de *H. italicum*, como mono e di-dicafeoilquínicos, haviam já sido identificados para *H. stoechas* e *H. bracteatum*, sendo considerados característicos do género *Helichrysum* (Carini *et al.*, 2001). Outros compostos como apigenina-7-O-glucósido e canferol-3-O-glucósido identificados no extracto de *H. italicum* foram identificados também em *Helichrysum stoechas* (Carini *et al.*, 2001). No extracto aquoso foi detectada a presença de taxifolina-3-O-xilósido, um flavonóide com uma forte actividade antibacteriana contra *Streptococcus sobrinus* (Kuspradini *et al.*, 2009). Estudos realizados com *H. stoechas* e *H. italicum* mostraram a existência do flavonóide tetrahidroxichalcona-2-glucósido

(Carini *et al.*, 2001; Facino, Carini, Franzoi, Pirola & Bosisio, 1990), não detectada neste extracto. A identificação dos compostos por espectrometria de massa foi realizada por recolha de fracções por HPLC-DAD utilizando ácido fórmico como substituto de TFA, para posterior injeção no espectrómetro de massa. O uso de ácido fórmico implica uma diminuição na resolução do cromatograma obtido por HPLC-DAD com TFA no mesmo sistema de eluição (não mostrado), o que dificulta a recolha das fracções. Esta limitação foi observada em particular para os picos maioritários, o pico 3, identificado por espectrometria de massa como quercetina-4-O-glucósido e o pico 8, identificado como taxifolina-3-O-xilósido. Assim, será necessário realizar estudos de optimização do sistema de eluição de HPLC-DAD com ácido fórmico, de modo a melhorar a resolução dos cromatogramas obtidos, diminuir o erro associado ao cálculo da razão  $m/z$  e confirmar a identificação destes compostos.

## 2.2. *Santolina impressa*

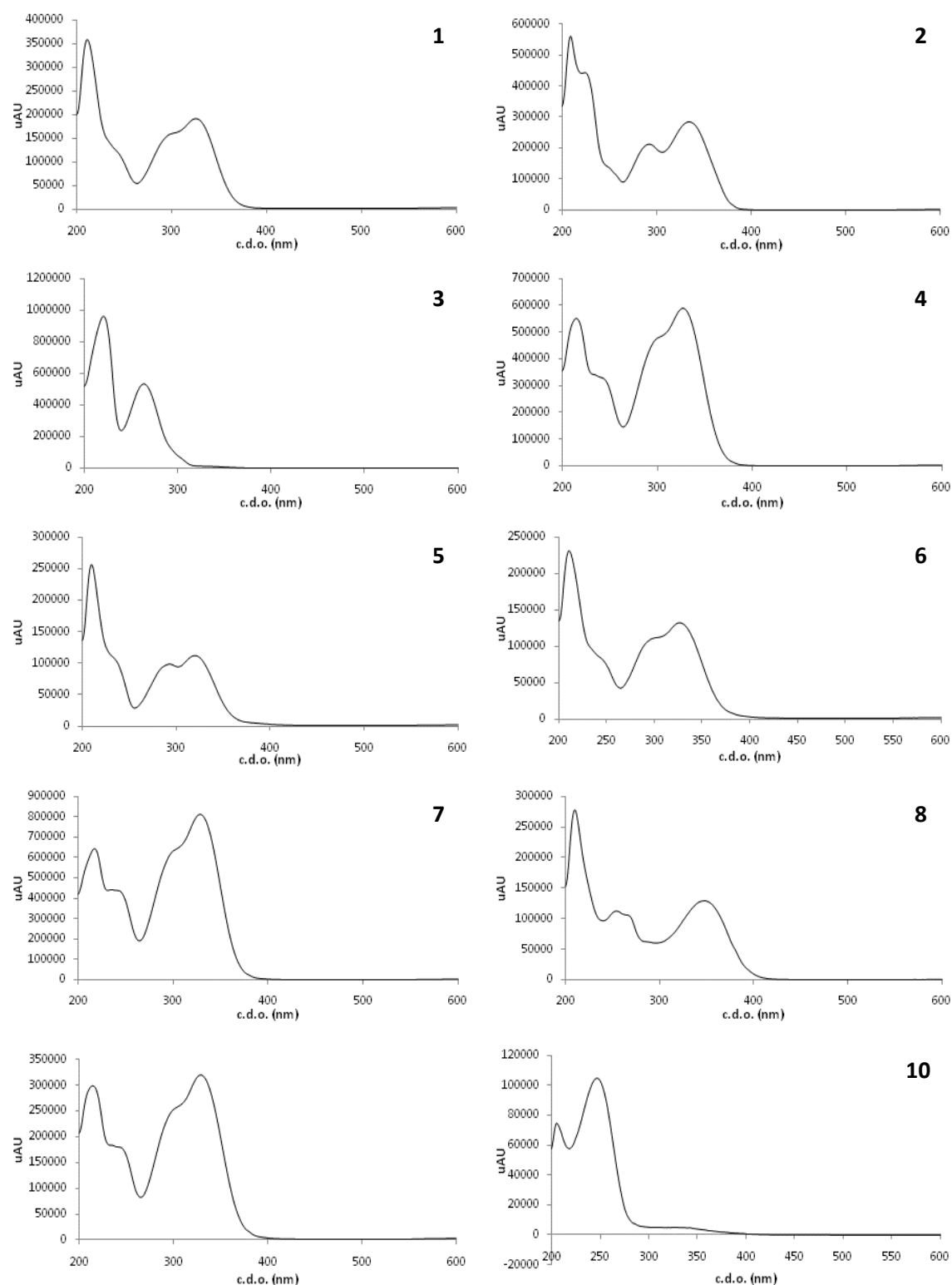
Os cromatogramas de HPLC-DAD para os extractos aquosos de caules/folhas e flores de *S. impressa* encontram-se representados nas Figuras 6A e 6B, respectivamente. No extracto aquoso de caules/folhas de *S. impressa*, foi possível detectar por HPLC-DAD dez picos maioritários com os seguintes Tr: 4,94 min, 6,98 min, 7,21 min, 8,24 min, 14,36 min, 16,34 min, 17,56 min, 19,00 min, 21,97 min e 30,64 min. No extracto aquoso das flores foram detectados sete picos maioritários, com os Tr de: 8,18 min, 12,36 min, 16,25 min, 17,47 min, 21,88 min, 30,57 min, 37,61 min.

Os cromatogramas de HPLC-DAD dos extractos aquosos de *S. impressa* apresentam algumas semelhanças entre si, embora no cromatograma correspondente o extracto de caules/folhas apresente uma maior concentração dos picos em relação ao extracto das flores. Por esta razão foram identificados os picos maioritários do extracto de caules/folhas de *S. impressa* detectados por HPLC-DAD. Os espectros de absorção UV-Visível para cada um dos picos maioritários identificados na Figura 6A, encontram-se representados na Figura 7. Os espectros de absorção UV-Visível para os picos maioritários do extracto aquoso das flores de *S. impressa* (Anexo F) apresentam uma grande semelhança com os espectros obtidos para o extracto aquoso de caules/folhas. À excepção dos picos 2 e 7, todos os restantes indicam a presença de compostos com a mesma composição química, nomeadamente com estrutura semelhante a ácido caféico, como haviam já sido identificados para *H. italicum* por comparação com o respectivo padrão. Por comparação com o padrão por HPLC-DAD, o pico 4 do extracto de caules/folhas e o pico 1 do extracto das flores de *S. impressa* foram identificados como ácido clorogénico. A identificação dos compostos presentes no extracto aquoso de caules/folhas de *S. impressa* encontra-se resumida na Tabela 5.



**Figura 6** - Cromatograma de HPLC-DAD do extracto aquoso de caules/folhas (**A**) e de flores (**B**) de *Santolina impressa* (1 mg/mL). Picos maioritários marcados de 1-10 e de 4-11, respectivamente.

Existem poucas informações na bibliografia referentes à composição de extractos aquosos de *Santolina impressa*. A maioria dos estudos referidos na bibliografia foram realizados com óleos essenciais de espécies do género *Santolina*. Contudo, em extractos etanólicos de *Santolina insularis* foram identificados os flavonóides, herniarina, luteolina-7-gucósido, apigenina e apigenina-7-glucósido (Sacchetti, Romagnoli, Ballero, Tosi & Poli 1997). No presente trabalho, por HPLC-DAD foi possível identificar nos extractos aquosos de *S. impressa* o componente maioritário como sendo ácido clorogénico, no entanto estudos por espectrometria de massa terão que ser realizados para se identificar os outros compostos que aparecem como dominantes por HPLC-DAD.



**Figura 7** - Espectros de absorção UV-Visível obtidos por HPLC-DAD para os oito picos maioritários do extracto aquoso de caules/folhas de *S. impressa* (1mg/mL): 1 (Tr = 4,94 min), 2 (Tr = 6,98 min), 3 (Tr = 7,21 min), 4 (Tr = 8,24 min), 5 (Tr = 14,36 min), 6 (Tr = 16,34 min), 7 (Tr = 17,56 min), 8 (Tr = 19,00 min), 9 (Tr = 21,97 min) e 10 (Tr = 30,64 min).

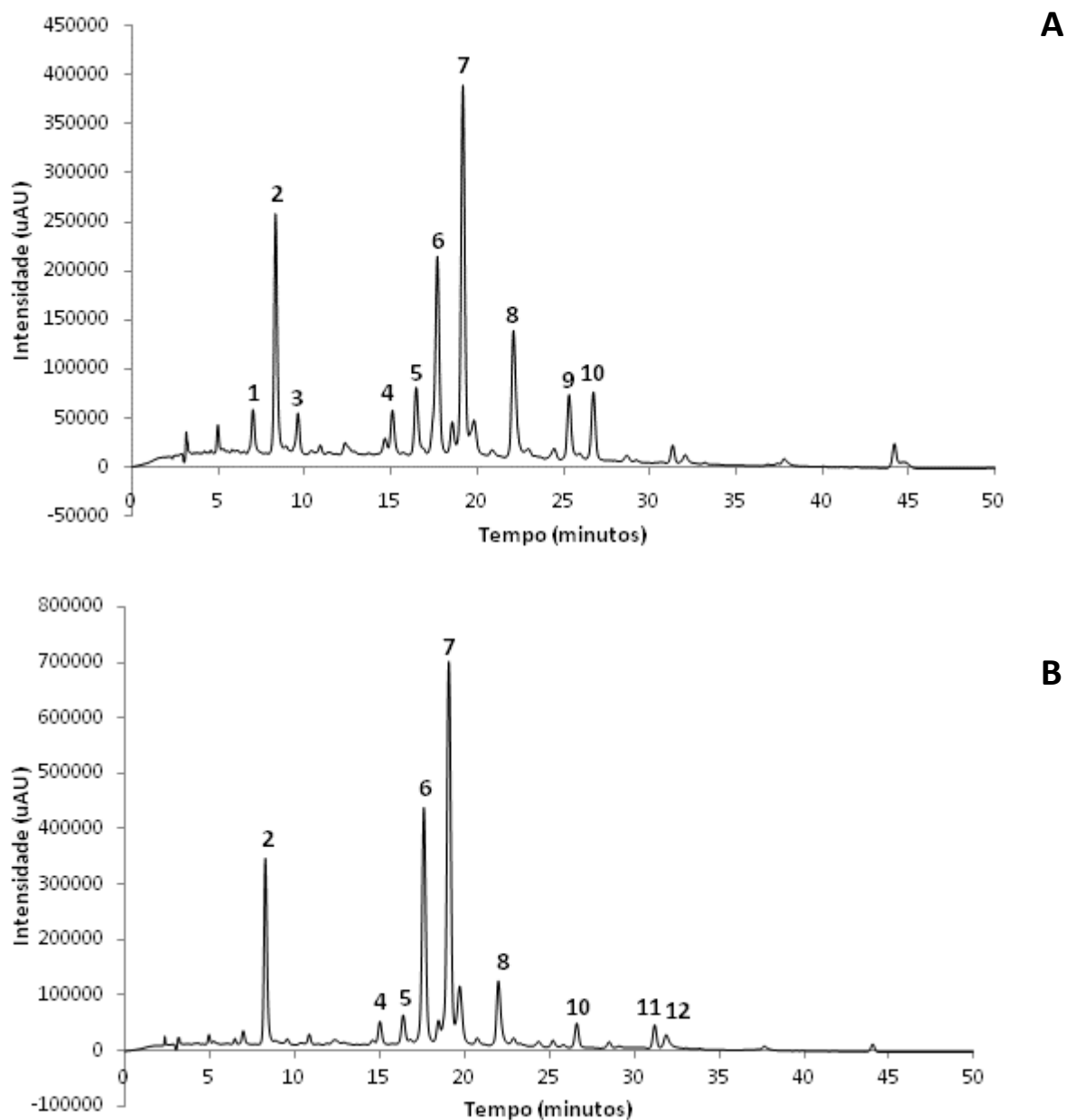
**Tabela 5** - Identificação dos picos maioritários do cromatograma de HPLC-DAD do extracto aquoso de caules/folhas de *Santolina impressa*.

Pico	Tr (min)	Composto
1	4,94	Estrutura química semelhante a ácido cafeíco
2	6,98	Estrutura química semelhante a ácido cafeíco
3	7,21	-----
4	8,24	Ácido clorogénico
5	14,36	Estrutura química semelhante a ácido cafeíco
6	16,34	Estrutura química semelhante a ácido cafeíco
7	15,56	Estrutura química semelhante a ácido cafeíco
8	19,00	-----
9	21,97	Estrutura química semelhante a ácido cafeíco
10	30,64	-----

### 2.3. *Solidago virgaurea*

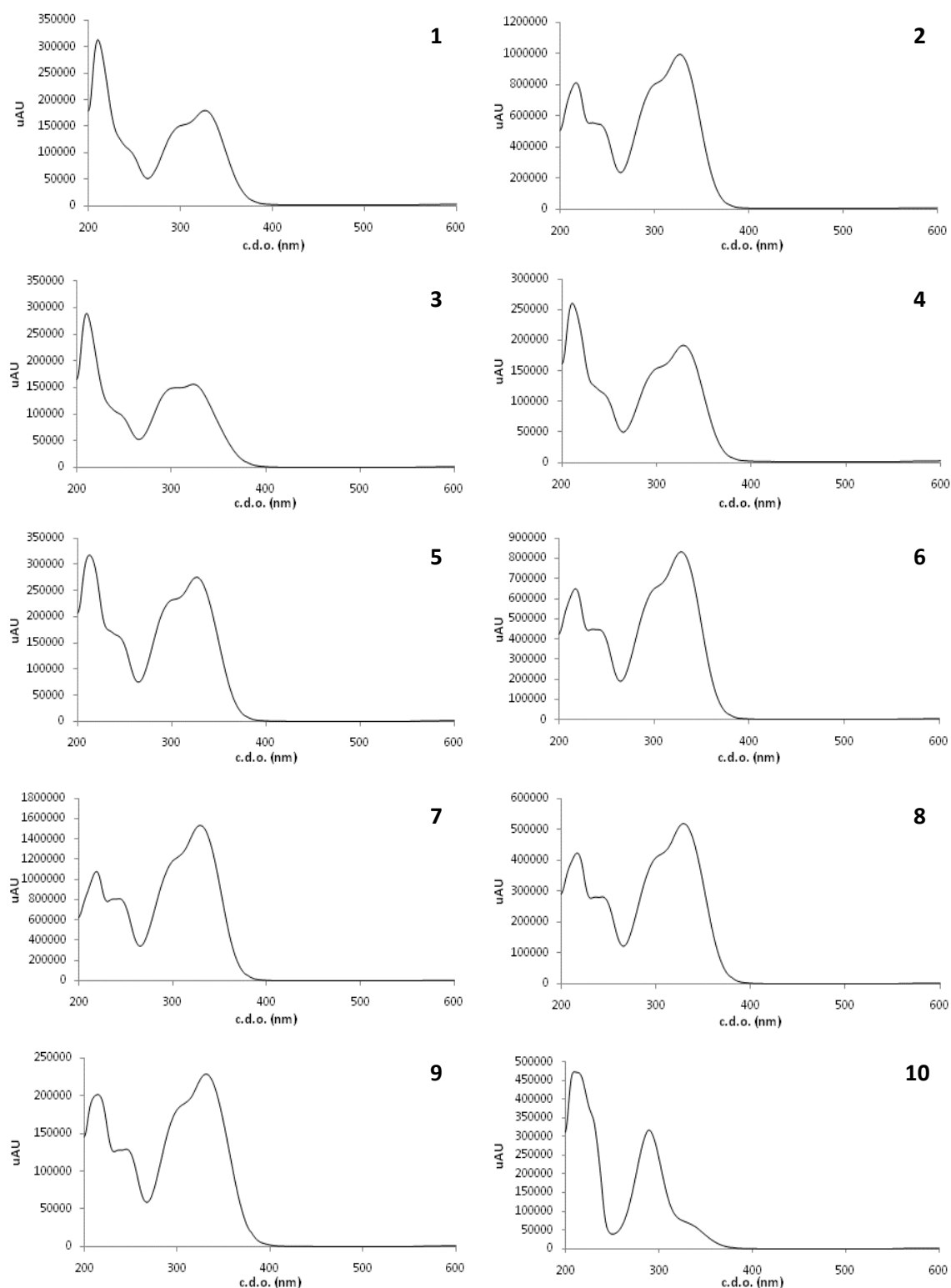
Nas Figuras 8A e 8B estão representados os cromatogramas de HPLC-DAD para os extractos aquosos de caules/folhas e flores de *S. virgaurea*, respectivamente. No extracto aquoso de caules/folhas de *S. virgaurea*, foi possível identificar dez picos maioritários com os seguintes Tr: 7,01 min, 8,31 min, 9,61 min, 15,09 min, 16,47 min, 17,69 min, 19,17 min, 22,10 min, 25,33 min e 26,74 min. No extracto aquoso das flores de *S. virgaurea* foram também identificados dez picos maioritários, com os Tr de: 8,28 min, 15,03 min, 16,41 min, 17,62 min, 19,10 min, 22,02 min, 26,64 min, 31,23 min e 31,91 min. Por comparação verifica-se que os Tr dos picos maioritários de ambos os extractos aquosos são bastante semelhantes.

Os cromatogramas de HPLC-DAD dos extractos aquosos de *S. virgaurea* apresentam algumas semelhanças entre si. Os espectros de absorção UV-Visível para cada um dos picos maioritários identificados nas Figuras 8A e 8B, para extracto aquoso de caules/folhas e flores de *S. virgaurea* encontram-se representados na Figura 10 e Anexo G, respectivamente. Neste caso também não foi possível por espectrometria de massa a identificação dos picos maioritários dos extractos. No entanto, por comparação com os padrões analisados por HPLC-DAD, foi possível identificar o pico 2 do extracto aquoso de caules/folhas e o pico 1 do extracto aquoso de flores de *S. virgaurea* como ácido clorogénico. À excepção do pico 10 do extracto aquoso de caule/folhas, todos os outros indicam a presença de compostos com composição química semelhante a ácido caféico. No extracto aquoso das flores, os picos 2-4 e 7 apresentam também um espectro de absorção de UV-Visível que indica a presença de compostos com estrutura semelhante a ácido caféico. Por comparação com o seu padrão, o pico 10 do extracto aquoso de flores foi identificado como luteolina. A identificação dos compostos presentes no extracto aquoso de caules/folhas de *S. virgaurea* encontra-se resumida na Tabela 6.



**Figura 8** - Cromatograma de HPLC-DAD de extracto aquoso de caules/folhas (**A**) e das flores (**B**) de *Solidago virgaurea* (1 mg/mL). Picos maioritários marcados de 1-10 e 2-12, respectivamente.

Consultando a bibliografia verifica-se que em extractos hidroalcoólicos de *Solidago chilensis* foram identificados como componentes maioritários rutina e ácidos cafeoilquínicos e dicafeoilquínicos, compostos que apresentam propriedades anti-inflamatórias (Tamura *et al.*, 2009). Em 1995 Bongartz & Hesse tinham identificado em extractos etanólicos de *S. virgaurea* ácido clorogénico, quercetina e a sua aglicona, quercetrina. A quercetrina e os rutosídeos são compostos que apresentam propriedades diuréticas e que foram também identificados em *Solidago gigantea* (Weber & Jakobs, 2004). Deste modo verifica-se que as três espécies estudadas são ricas em compostos com estrutura semelhante a ácido caféico o que segundo Jaiswal, Kiprotich & Kuhnert (2011) é característico da família Asteracea.



**Figura 9** - Espectros de absorção UV-Visível obtidos por HPLC-DAD para os oito picos maioritários do extracto aquoso de caules/folhas de *Solidago virgaurea* (1mg/mL): 1 (Tr = 7,01 min), 2 (Tr = 8,31 min), 3 (Tr = 9,61 min), 4 (Tr = 15,09 min), 5 (Tr = 16,47 min), 6 (Tr = 17,69 min), 7 (Tr = 19,17 min), 8 (Tr = 22,10 min), 9 (Tr = 25,33 min) e 10 (Tr = 26,74 min).

**Tabela 6** - Identificação dos picos maioritários do cromatograma de HPLC do extracto aquoso de *Solidago virgaurea* (folhas).

Pico	Composto
1	Estrutura química semelhante a ácido cafeíco
2	Ácido clorogénico
3	Estrutura química semelhante a ácido cafeíco
4	Estrutura química semelhante a ácido cafeíco
5	Estrutura química semelhante a ácido cafeíco
6	Estrutura química semelhante a ácido cafeíco
7	Estrutura química semelhante a ácido cafeíco
8	Estrutura química semelhante a ácido cafeíco
9	Estrutura química semelhante a ácido cafeíco
10	-----

### 3. Metabolismo *in vitro* dos extractos aquosos de *Helichrysum italicum*, *Santolina impressa* e *Solidago virgaurea*

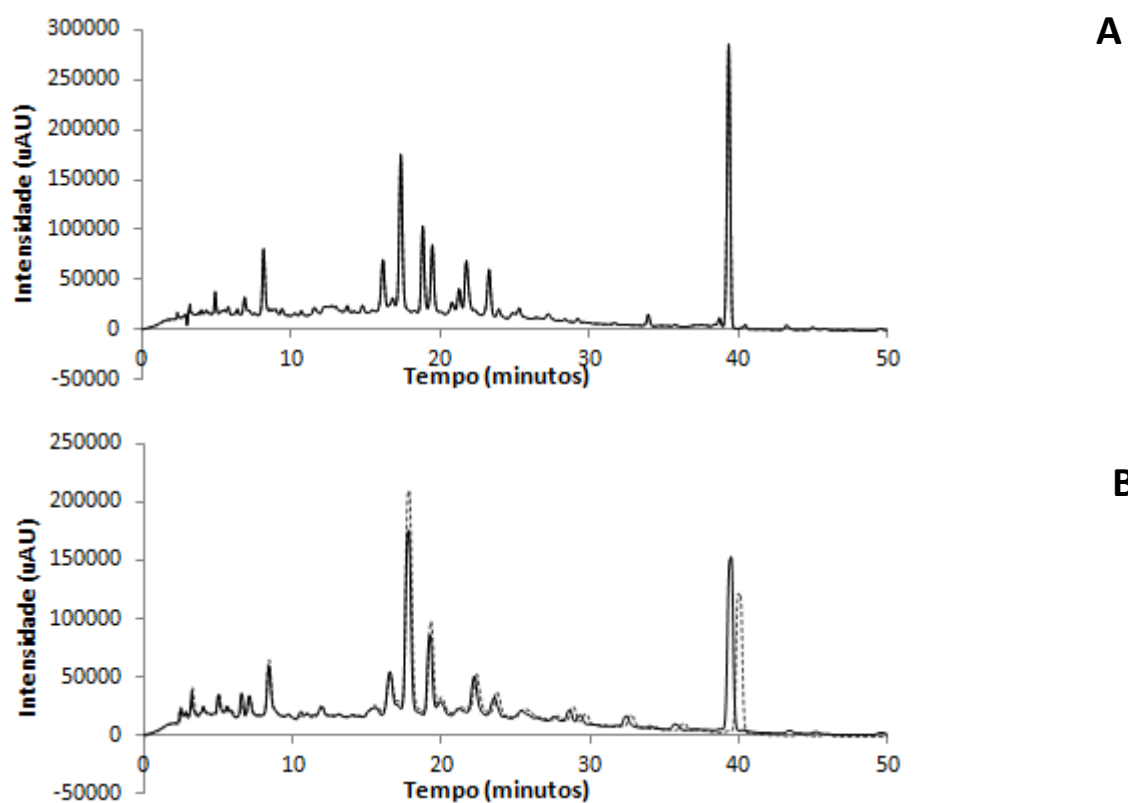
Ao serem ingeridas, as decocções são sujeitas ao efeito dos sucos digestivos e acção das células localizadas ao longo do tracto gastrointestinal. Para estudar a possível degradação dos compostos presentes nos extractos aquosos de *H. italicum*, *S. impressa* e *S. virgaurea* ao longo do tracto gastrointestinal realizaram-se ensaios *in vitro* com os sucos gástrico e pancreático artificiais e com  $\beta$ -glucuronidase de *Escherichia coli*.

#### 3.1. Digestão dos Extractos Aquosos pelo Suco Gástrico Artificial

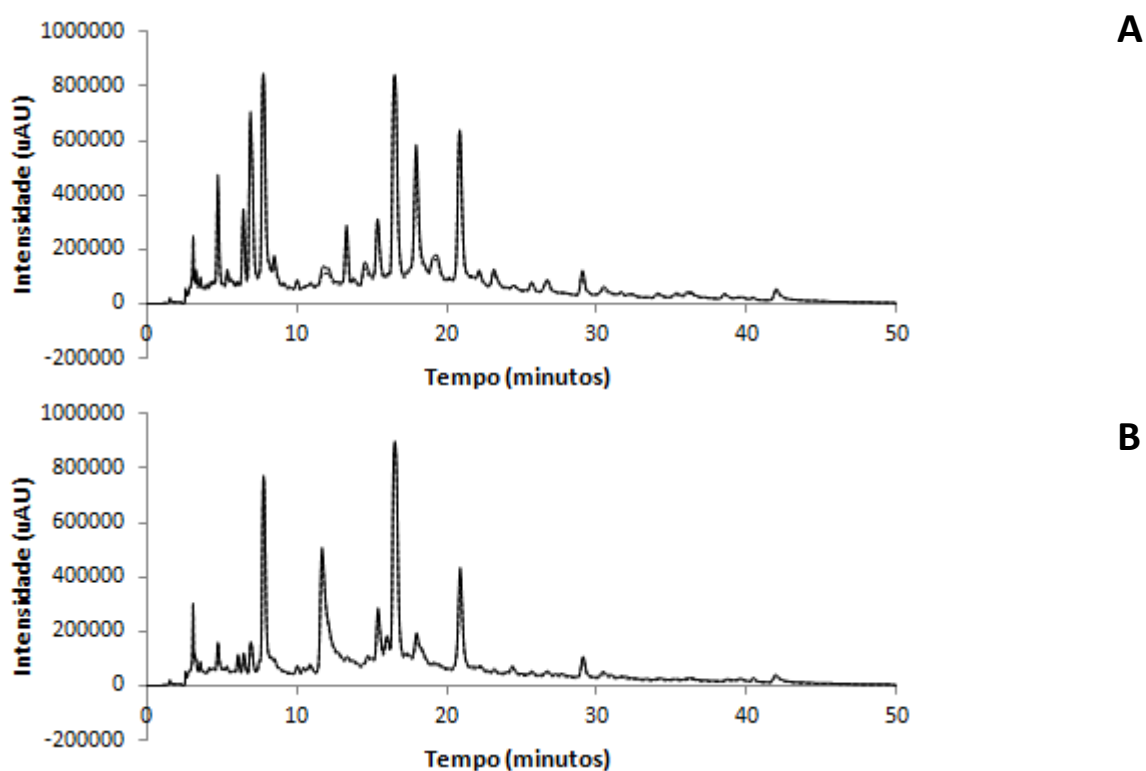
Os extractos aquosos de caules/folhas e flores de *H. italicum*, *S. impressa* e *S. virgaurea* foram analisados por HPLC-DAD após digestão com suco gástrico artificial durante quatro horas. Apesar de uma leve digestão no estômago, entre 60 e 110 minutos, o prolongamento do processo permite avaliar o aumento de bioconversões de compostos ao longo do tempo tal como preconizado por (Porfírio *et al.*, 2010).

A análise dos cromatogramas para cada uma das espécies permite verificar que os extractos aquosos não sofreram degradações significativas na presença do suco gástrico artificial (Figuras 10-12). Os extractos aquosos apresentam-se assim bastante estáveis na presença deste suco digestivo, uma vez que na presença de ácido clorídrico (pH 1) e pepsina nenhum dos seus constituintes sofreu hidrólise química ou enzimática sob condições ácidas ao longo das 4 horas de incubação. Apenas o extracto aquoso de flores de *H. italicum* apresentou ligeiras variações nos picos maioritários havendo um aumento da área do pico 7 ( $T_r = 39,40$  min) e uma diminuição da área do pico 3 ( $T_r = 17,38$  min).

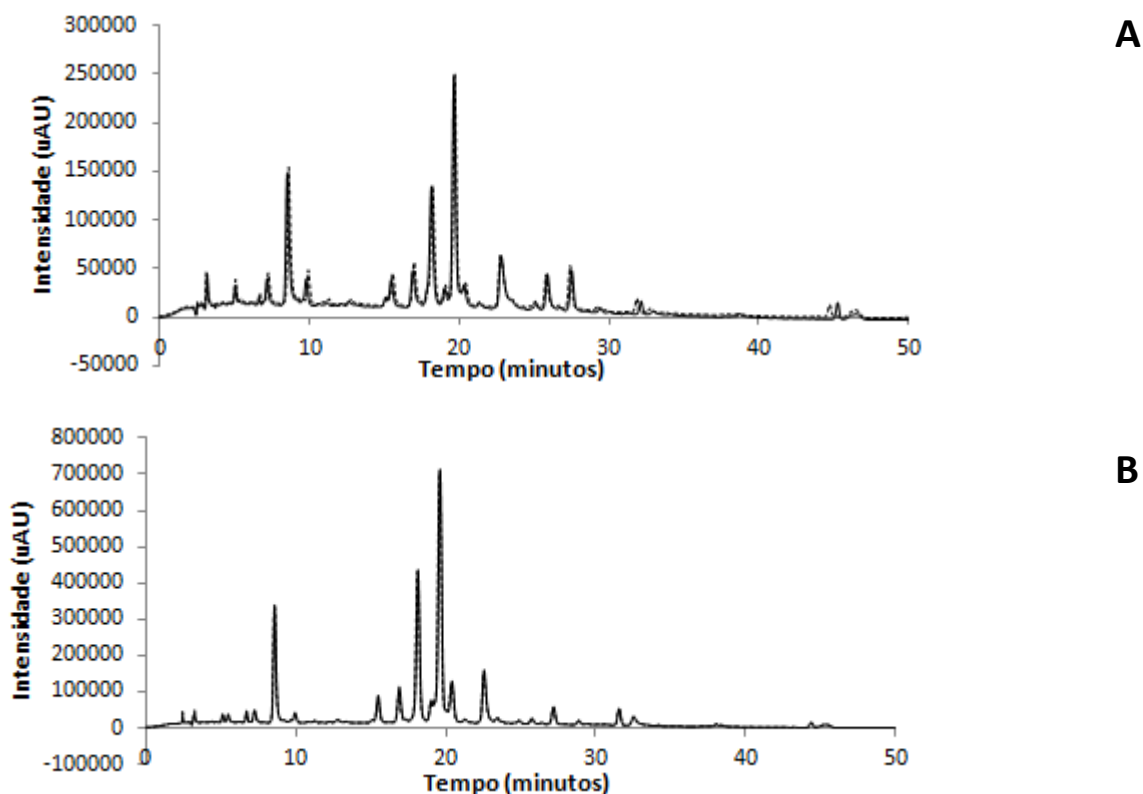




**Figura 10** - Cromatograma de HPLC-DAD antes (....) e após 4 horas de incubação (\_\_\_) de extracto aquoso de caules/folhas (A) e de flores (B) de *Helichrysum italicum* com suco gástrico artificial.



**Figura 11** - Cromatograma de HPLC-DAD antes (....) e após (\_\_\_) incubação de extracto aquoso de caules/folhas (A) e das flores (B) de *Santolina impressa* com suco gástrico artificial.



**Figura 12** - Cromatograma de HPLC-DAD antes (....) e após (\_\_\_) incubação de extracto aquoso de caules/folhas (A) e de flores (B) de *Solidago virgaurea* com suco gástrico artificial.

A influência do suco gástrico artificial nas actividades biológicas dos extractos (actividade antioxidante e actividade inibitória de AChE) foi também avaliada. Para a determinação destas actividades foram utilizadas concentrações próximas dos valores de  $EC_{50}$  e  $IC_{50}$ . Os resultados obtidos para as actividades antioxidante e inibitória de AChE dos extractos aquosos das espécies em estudo encontram-se sumarizados nas Tabelas 7 e 8, respectivamente.

**Tabela 7** - Actividade antioxidante expressa em concentração eficiente ( $EC_{50}$ ) determinada pelo método DPPH para extractos aquosos de *H. italicum*, *S. impressa* e *S. virgaurea* ao longo de 4 horas de incubação com suco gástrico artificial. Valores expressos em %  $\pm$  d.p. de 3 replicados ( $p < 0,05$ ).

Tempo (h)	<i>Helichrysum italicum</i>		<i>Santolina impressa</i>		<i>Solidago virgaurea</i>	
	Folhas	Flores	Folhas	Flores	Folhas	Flores
0	100,0 $\pm$ 2,5	100,0 $\pm$ 2,3	100,0 $\pm$ 1,3	100,0 $\pm$ 1,4	100,0 $\pm$ 6,4	100,0 $\pm$ 5,6
1	101,3 $\pm$ 1,6	102,6 $\pm$ 2,6	93,9 $\pm$ 3,5	98,7 $\pm$ 2,1	89,7 $\pm$ 3,5	99,4 $\pm$ 7,5
2	99,2 $\pm$ 1,5	109,3 $\pm$ 0,9	99,5 $\pm$ 2,7	97,5 $\pm$ 1,3	100,5 $\pm$ 2,7	113,3 $\pm$ 7,3
3	99,5 $\pm$ 1,0	107,8 $\pm$ 1,2	99,8 $\pm$ 1,3	98,8 $\pm$ 0,5	110,8 $\pm$ 4,3	117,0 $\pm$ 1,4
4	98,1 $\pm$ 2,1	95,1 $\pm$ 3,0	97,7 $\pm$ 2,1	100,7 $\pm$ 1,2	107,7 $\pm$ 2,4	113,9 $\pm$ 4,4

**Tabela 8** - Capacidade inibitória do enzima acetilcolinesterase ( $IC_{50}$ ) determinada pelo método modificado de Ellman para extractos aquosos de *H. italicum*, *S. impressa* e *S. virgaurea* ao longo de 4 horas de incubação com suco gástrico artificial. Valores expressos em %  $\pm$  d.p. de 3 replicados ( $p < 0,05$ ).

Tempo (h)	<i>Helichrysum italicum</i>		<i>Santolina impressa</i>		<i>Solidago virgaurea</i>	
	Folhas	Flores	Folhas	Flores	Folhas	Flores
0	100,0 $\pm$ 1,3	100,0 $\pm$ 0,6	100,0 $\pm$ 0,3	100,0 $\pm$ 0,9	100,0 $\pm$ 4,4	100,0 $\pm$ 1,0
1	99,6 $\pm$ 2,2	91,7 $\pm$ 1,0	99,8 $\pm$ 2,0	99,7 $\pm$ 1,3	103,7 $\pm$ 2,8	90,0 $\pm$ 3,7
2	101,3 $\pm$ 1,9	99,0 $\pm$ 0,8	100,3 $\pm$ 2,9	97,0 $\pm$ 2,5	93,9 $\pm$ 2,7	85,9 $\pm$ 1,1
3	97,8 $\pm$ 0,9	108,4 $\pm$ 4,0	99,5 $\pm$ 1,2	97,4 $\pm$ 3,3	87,1 $\pm$ 1,3	90,5 $\pm$ 2,8
4	96,1 $\pm$ 3,3	85,6 $\pm$ 6,6	100,2 $\pm$ 3,2	96,6 $\pm$ 5,1	89,3 $\pm$ 2,6	93,2 $\pm$ 1,1

A análise dos resultados obtidos (Tabelas 7 e 8) permite concluir que os extractos aquosos das flores e folhas das espécies em estudo mantêm a actividade antioxidante e inibitória de AChE ao longo das 4 horas de incubação com suco gástrico artificial, sendo as percentagens de extinção do radical DPPH e inibição de AChE praticamente constantes ao longo desse período. Os resultados estão de acordo com o esperado, uma vez que os cromatogramas obtidos por HPLC também se mantiveram praticamente inalterados ao longo das 4 horas de incubação com suco gástrico artificial.

Os resultados são semelhantes aos obtidos em outros extractos aquosos de espécies de Asteraceae e Apiaceae, nomeadamente em *Helichrysum stoechas* (Silva, 2010) e *Foeniculum vulgare* (Carrilho, 2009). O pH ácido do estomago bem como a pepsina como não hidrolisam derivados de ácido cafeico, quer sejam ácidos fenólicos ou flavonóides, o que pode ser justificado pela presença de compostos conjugados, uma vez que estes parecem não ser degradados em condições gástricas (Crespy *et al.*, 2002). Em todos os trabalhos referidos a composição química bem como as actividades biológicas mantiveram-se constantes ao longo do tempo do ensaio.

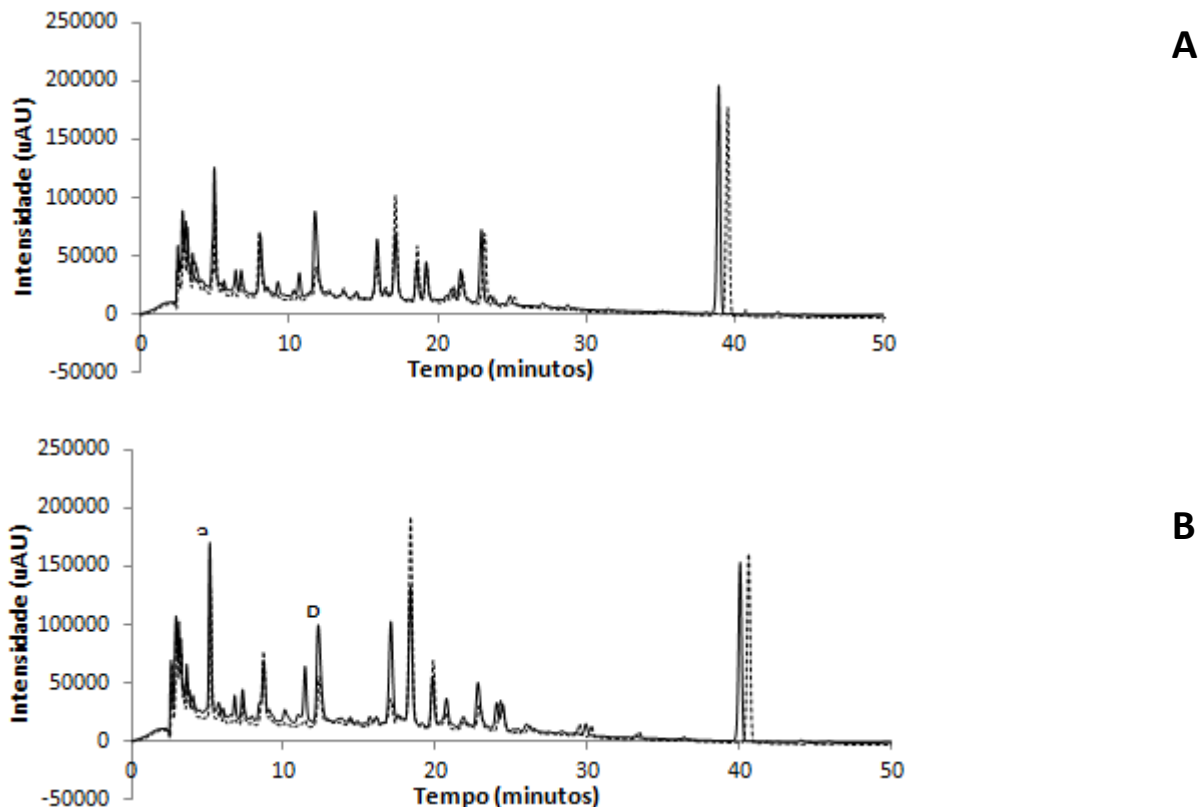
### 3.2 Digestão dos Extractos Aquosos pelo Suco Pancreático Artificial

Os extractos aquosos caules/folhas e flores de *H. italicum*, *S. impressa* e *S. virgaurea* foram analisados por HPLC-DAD após digestão com suco pancreático artificial, durante 4 horas. A mistura de enzimas hidrolíticos (amilase, lipase e protease) a PH básico, que constitui o suco pancreático artificial simula as condições geralmente encontradas no intestino delgado (Yamamoto *et al.*, 1999).

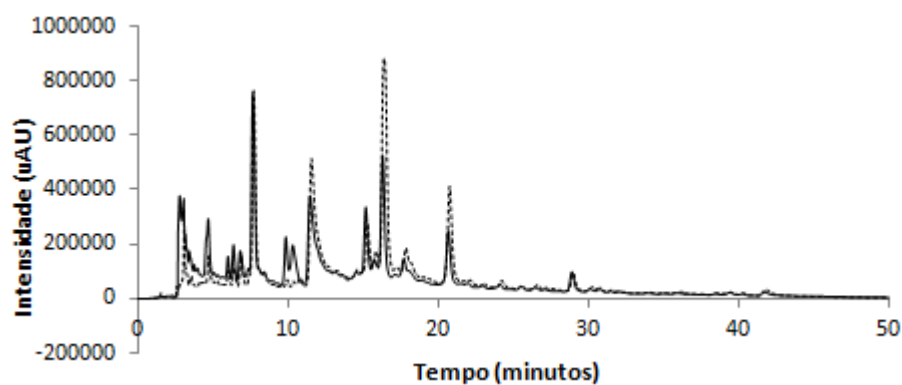
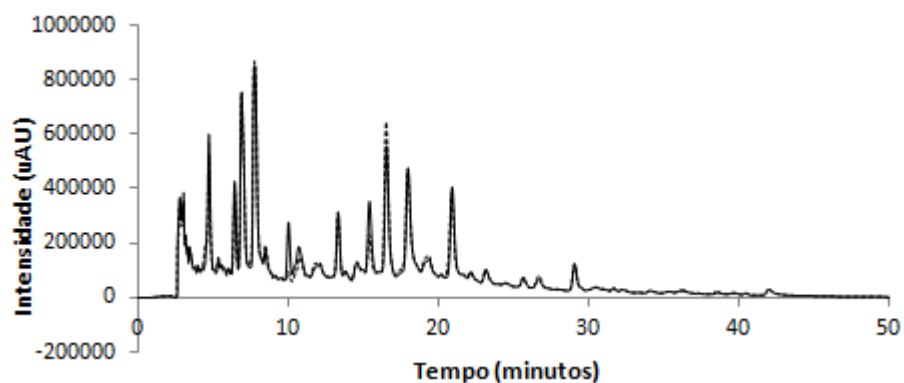
O resultado da digestão dos extractos aquosos pela acção do suco pancreático artificial encontra-se apresentado nos cromatogramas de HPLC-DAD das Figuras 13-15. Ao analisar esses cromatogramas de HPLC-DAD verifica-se que não houve alterações significativas dos perfis cromatográficos. À semelhança do verificado com suco gástrico artificial, não ocorreu, ao longo das quatro horas de incubação, degradação significativa dos compostos presentes nos extractos aquosos.

No entanto, verifica-se uma ligeira diminuição na área dos picos maioritários dos extractos aquosos de caules/folhas e flores de *H. italicum*, *S. impressa* e *S. virgaurea* ao fim de quatro horas de incubação com o suco pancreático artificial. No extracto aquoso de caules/folhas de *H. italicum* observa-se ainda que ocorre um ligeiro aumento da área do pico maioritário. A alteração dos picos poderá ter ocorrido devido ao pH do meio ou ao enzima pancreatina presente no suco. O pH do meio pode facilitar a hidrólise química, em meio básico, dos compostos do extracto aquoso e a degradação enzimática poderá conduzir a uma metabolização destes compostos, traduzindo-se numa diminuição da área dos picos dos cromatogramas.

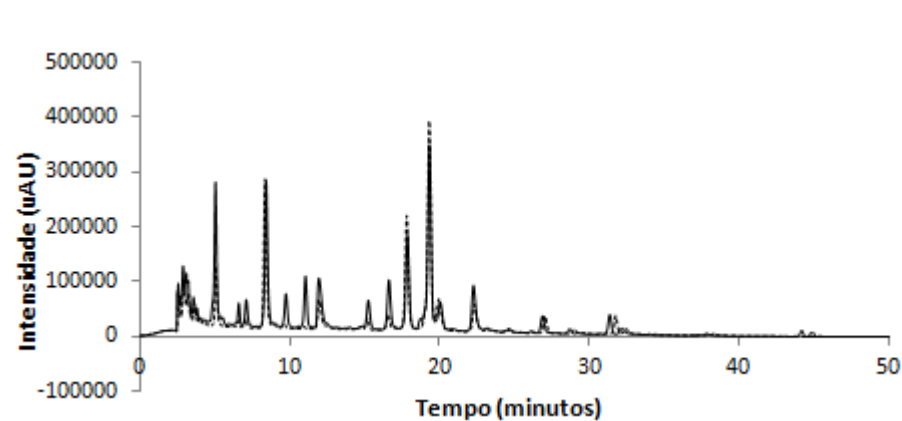
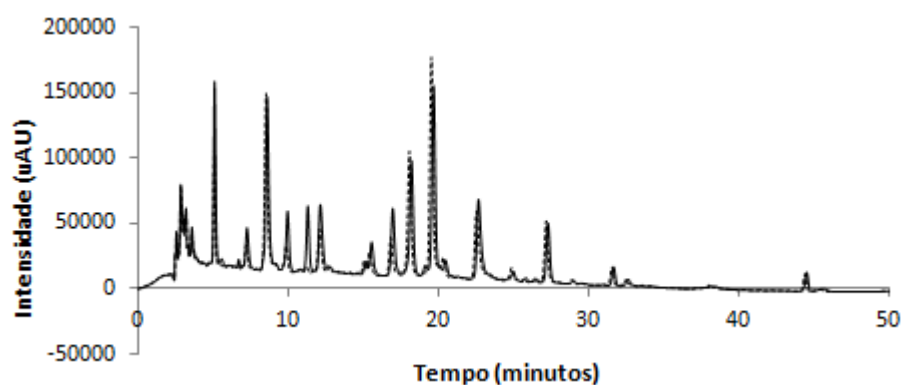
Ao comparar os perfis cromatográficos dos extractos aquosos, após digestão com suco pancreático artificial (Figuras 13-15), com os perfis cromatográficos dos extractos aquosos (Figuras 2,3,5,6,8,9), verifica-se em todos os cromatogramas uma diminuição de área relativa dos picos maioritários em relação ao extracto aquoso. Essa diminuição é mais acentuada para o extracto aquoso de folhas de *H. italicum*, o que pode dever-se a uma degradação de compostos ou à deposição de compostos juntamente com o material no passo de centrifugação. Em todos os cromatogramas observa-se o aparecimento de alguns picos com Tr iniciais e um pico com Tr entre os 11 e os 12 minutos, correspondentes a componentes do suco e à pancreatina, respectivamente e comprovado pela injeção do suco pancreático artificial, sem adição de extracto aquoso (Anexo H).



**Figura 13** - Cromatograma de HPLC-DAD antes (....) e após (\_\_\_) incubação de extracto aquoso de caules/folhas (A) e de flores (B) de *Helichrysum italicum* com suco pancreático artificial.



**Figura 14** - Cromatograma de HPLC-DAD antes (....) e após (\_\_\_) incubação de extracto aquoso de caules/folhas (**A**) e das flores (**B**) de *Santolina impressa* com suco pancreático artificial.



**Figura 15** - Cromatograma de HPLC-DAD antes (....) e após (\_\_\_) incubação de extracto aquoso de caules/folhas (**A**) e de flores (**B**) de *Solidago virgaurea* com suco pancreático artificial.

A influência do suco pancreático artificial nas actividades biológicas dos extractos (actividade antioxidante e actividade inibitória de AChE) foi também avaliada. Para a determinação destas actividades foram utilizadas concentrações próximas dos valores de  $EC_{50}$  e  $IC_{50}$ . Os resultados obtidos para as actividades antioxidante e inibitória de AChE dos extractos aquosos das espécies em estudo encontram-se resumidos nas Tabelas 9 e 10, respectivamente. À semelhança do verificado com o metabolismo gástrico *in vitro*, não foram verificadas alterações significativas nas actividades biológicas após adição de suco pancreático artificial. Os resultados estão de acordo com os obtidos em estudos anteriores com *Helichrysum stoechas* (Silva, 2010) e *Foeniculum vulgare* (Carrilho, 2009), corroborando ainda a informação divulgada por Crespy *et al.* (2002), onde é referido que a maior parte dos polifenóis parece resistir à hidrólise gástrica e pancreática, chegando intactos ao intestino delgado, principal órgão envolvido na absorção e metabolização de polifenóis.

**Tabela 9** - Actividade antioxidante expressa em concentração eficiente ( $EC_{50}$ ) determinada pelo método DPPH para extractos aquosos de *H. italicum*, *S. impressa* e *S. virgaurea* ao longo de 4 horas de incubação com suco pancreático artificial. Valores expressos em %  $\pm$  d.p. de 3 replicados. \* Valores significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Tempo (h)	<i>Helichrysum italicum</i>		<i>Santolina impressa</i>		<i>Solidago virgaurea</i>	
	Folhas	Flores	Folhas	Flores	Folhas	Flores
0	100,0 $\pm$ 0,6	100,0 $\pm$ 3,0	100,0 $\pm$ 3,0	100,0 $\pm$ 2,0	100,0 $\pm$ 2,8	100,0 $\pm$ 0,5
1	100,3 $\pm$ 2,5	114,0 $\pm$ 3,2	100,0 $\pm$ 3,2	103,0 $\pm$ 3,1	100,6 $\pm$ 5,6	95,4 $\pm$ 1,5
2	101,1 $\pm$ 1,5	118,7 $\pm$ 1,7*	98,7 $\pm$ 2,3	101,7 $\pm$ 1,3	102,0 $\pm$ 6,2	107,9 $\pm$ 6,0
3	103,3 $\pm$ 2,2	112,0 $\pm$ 3,0	99,2 $\pm$ 3,1	99,0 $\pm$ 2,0	110,6 $\pm$ 1,1	96,0 $\pm$ 2,0
4	99,4 $\pm$ 2,1	111,5 $\pm$ 2,5	101,5 $\pm$ 1,2	98,5 $\pm$ 3,0	92,1 $\pm$ 3,4	95,3 $\pm$ 4,3

**Tabela 10** - Capacidade inibitória do enzima acetilcolinesterase ( $IC_{50}$ ) determinada pelo método modificado de Ellman para extractos aquosos de *H. italicum*, *S. impressa* e *S. virgaurea* ao longo de 4 horas de incubação com suco pancreático artificial. Valores expressos em %  $\pm$  d.p. de 3 replicados. \* Valores significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

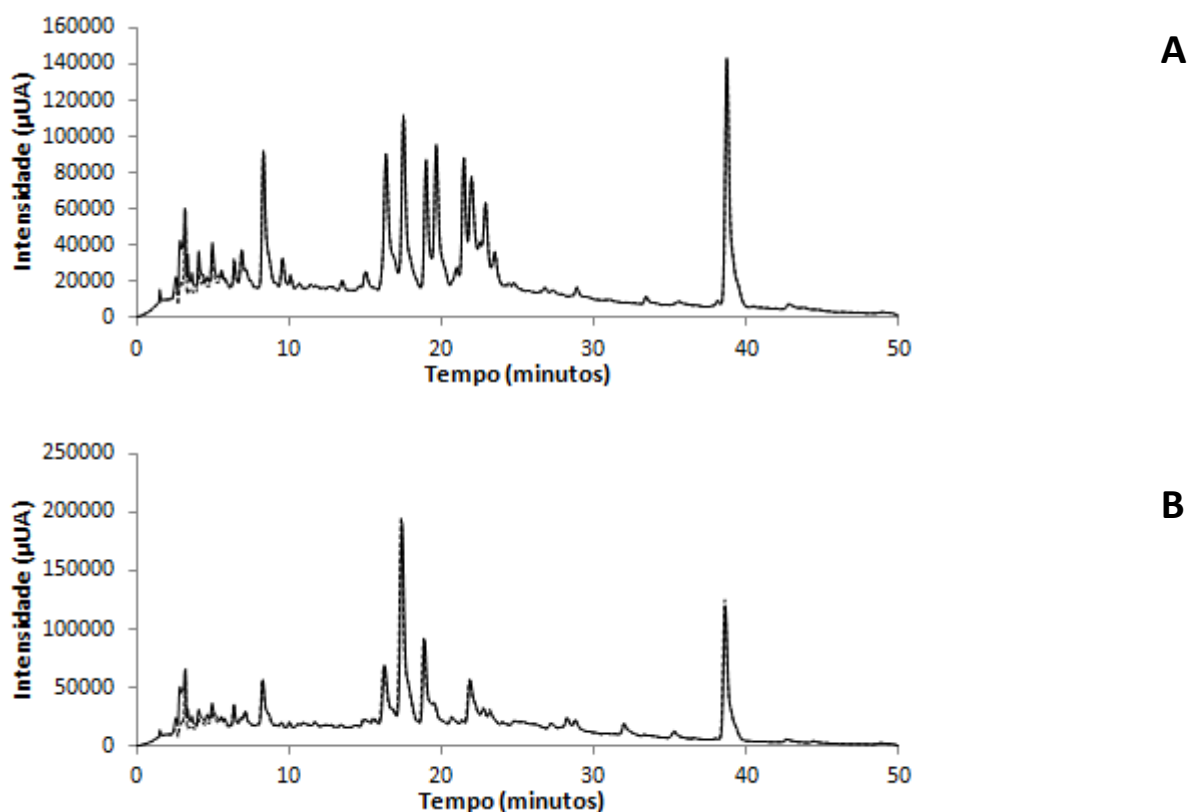
Tempo (h)	<i>Helichrysum italicum</i>		<i>Santolina impressa</i>		<i>Solidago virgaurea</i>	
	Folhas	Flores	Folhas	Flores	Folhas	Flores
0	100,0 $\pm$ 0,8	100,0 $\pm$ 2,5	100,0 $\pm$ 1,8	100,0 $\pm$ 0,2	100,0 $\pm$ 0,6	100,0 $\pm$ 0,8
1	95,0 $\pm$ 0,2	88,1 $\pm$ 1,5	93,0 $\pm$ 1,2	92,2 $\pm$ 2,5	92,6 $\pm$ 1,8*	86,2 $\pm$ 1,4*
2	88,5 $\pm$ 1,5*	93,8 $\pm$ 4,7	88,9 $\pm$ 1,9	92,3 $\pm$ 4,3	91,4 $\pm$ 0,4*	78,1 $\pm$ 0,8*
3	83,5 $\pm$ 0,4*	96,2 $\pm$ 0,1	86,4 $\pm$ 1,3	90,3 $\pm$ 1,1	103,6 $\pm$ 5,3	73,5 $\pm$ 0,4*
4	85,6 $\pm$ 3,5	80,5 $\pm$ 1,8*	86,6 $\pm$ 4,5	88,6 $\pm$ 2,8	95,9 $\pm$ 0,1	76,3 $\pm$ 1,2*

### 3.3. Digestão por $\beta$ -glucuronidase de *Escherichia coli*

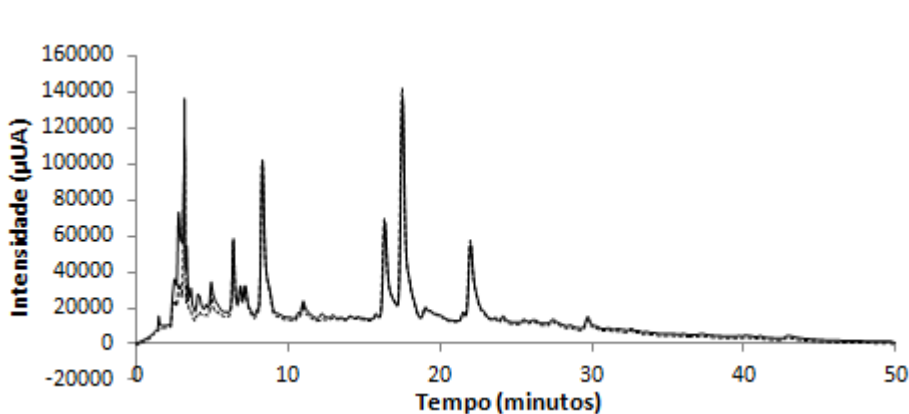
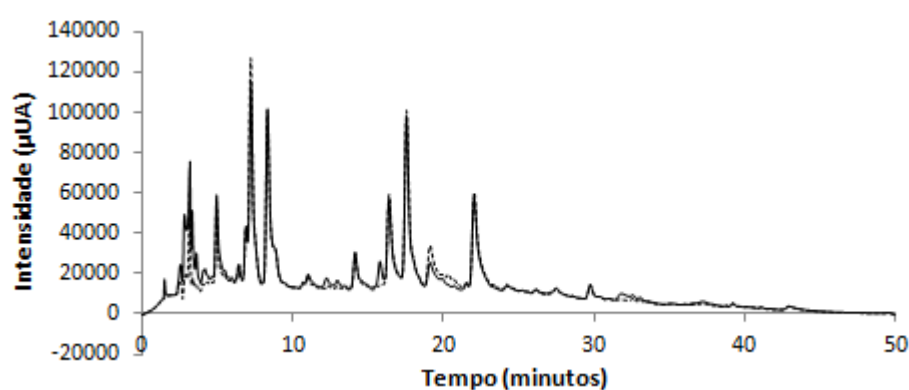
Com este ensaio pretendeu-se verificar se os extractos aquosos de caules/folhas e flores de *H. italicum*, *S. impressa* e *S. virgaurea* sofrem degradação na presença da  $\beta$ -glucuronidase. Este enzima, detectado em bactérias pertencentes à flora intestinal humana, desempenha um papel

importante na produção de metabolitos tóxicos e cancerígenos no intestino grosso e na absorção e circulação entero-hepática de resíduos de agliconas libertados por hidrólise dos respectivos glucurónidos (Beaud, Tailliez & Anba-Mondoloni, 2005).

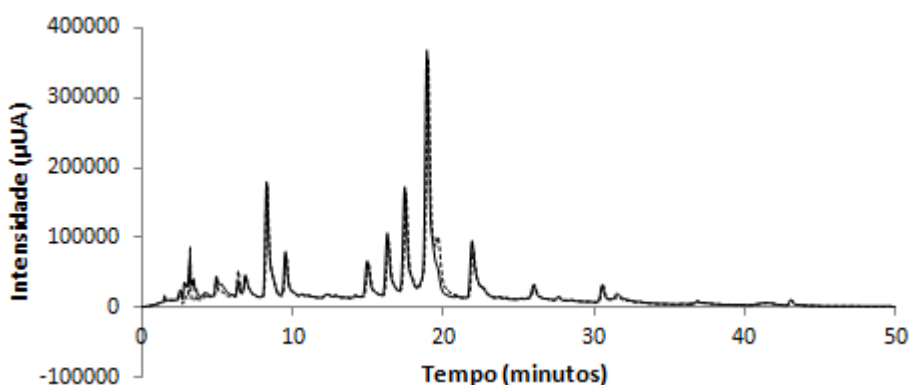
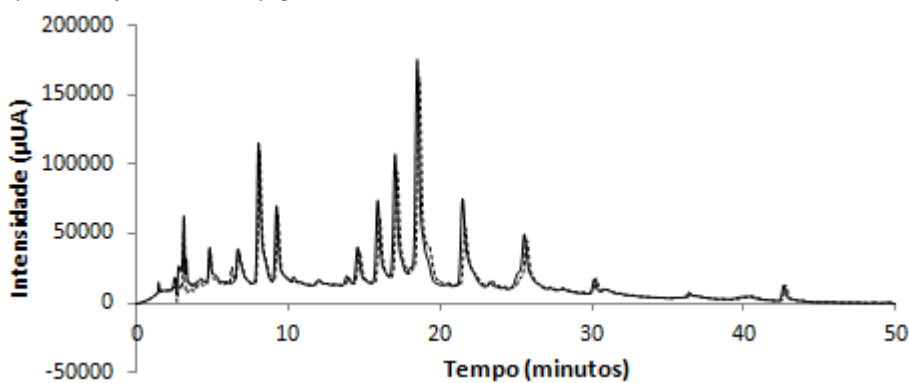
Nas Figuras 16-18 encontram-se representados os cromatogramas obtidos para os extractos aquosos de caules/folhas e flores de *H. italicum*, *S. impressa* e *S. virgaurea* antes e após digestão com o enzima  $\beta$ -glucuronidase. Pela análise dos cromatogramas é possível observar que os extractos aquosos não sofreram degradação na presença da  $\beta$ -glucuronidase, ou seja, os compostos não sofreram reacções de desglucuronidação. Assim, os extractos aquosos em estudo não possuem compostos glucurónidos, uma vez que não foram observadas diferenças significativas nos cromatogramas dos extractos aquosos. Este facto está também de acordo com as estruturas químicas determinadas por espectrometria de massa. Deste modo é expectante que as actividades biológicas mantenham valores semelhantes aos determinados anteriormente.



**Figura 16** – Cromatograma de HPLC-DAD da desglucuronidação do extracto aquoso de caules/folhas (A) e de flores (B) de *Helichrysum italicum*. (---) Cromatograma obtido para o extracto aquoso; (—) Cromatograma obtido para o extracto aquoso depois da acção do enzima  $\beta$ -glucuronidase de *Escherichia coli*.



**Figura 17** - Cromatograma de HPLC-DAD da desglucuronidação do extracto aquoso de caules/folhas (**A**) e de flores (**B**) de *Santolina impressa*. (---) Cromatograma obtido para o extracto aquoso; (—) Cromatograma obtido para o extracto aquoso depois da acção do enzima  $\beta$ -glucuronidase de *Escherichia coli*.



**Figura 18** - Cromatograma de HPLC-DAD da desglucuronidação do extracto aquoso de caules/folhas (**A**) e de flores (**B**) de *Solidago virgaurea*. (---) Cromatograma obtido para o extracto aquoso; (—) Cromatograma obtido para o extracto aquoso depois da acção do enzima  $\beta$ -glucuronidase de *Escherichia coli*.



#### 4. Determinação da Citotoxicidade dos Extractos Aquosos de *Helichrysum italicum*, *Santolina impressa* e *Solidago virgaurea*

A citotoxicidade dos extractos aquosos de *H. italicum*, *S. impressa* e *S. virgaurea* em células humanas foi avaliado em células HeLa, uma linha celular derivada do epitélio do adenocarcinoma cervical e Caco-2, uma linha de células epiteliais do adenocarcinoma colo-rectal, utilizadas para mimetizar o epitélio intestinal. Os valores de IC<sub>50</sub> para os extractos aquosos das espécies em estudo encontram-se resumidos na Tabela 11.

O ensaio de MTT mostrou que os extractos aquosos diminuíram em 50% a viabilidade das células HeLa e Caco-2 em concentrações próximas ou superiores a 0,1 mg/mL, um valor adoptado em vários estudos como referência de citotoxicidade para várias linhas celulares (Cárdenas, Marder, Blank & Roguin, 2006; Oonsivilai, Ferruzi & Ningsanond, 2007). O extracto aquoso de folhas de *H. italicum* apresentou um valor de IC<sub>50</sub> próximo do limite para células Caco-2. Dos constituintes maioritários do extracto aquoso de folhas de *H. italicum* identificados por espectrometria de massa, apenas a quercetina é descrita na literatura como possuindo algum efeito citotóxico. No entanto, estudos de citotóxicidade realizados com quercetina em células Caco-2 mostram que o efeito citotóxico é apenas verificado durante a fase proliferativa das células (Agullo, Gamet, Besson, Demigné & Rémésy, 1994). O extracto aquoso de *S. virgaurea* não apresentou toxicidade para as concentrações testadas. Por motivos alheios à nossa vontade não foi realizado o ensaio de citotoxicidade do extracto aquoso de *S. impressa* em células HeLa. No entanto, uma vez que o valor de IC<sub>50</sub> deste extracto para células Caco-2 foi bastante superior a 100 µg/mL, é esperado que também não seja considerado tóxico para células HeLa.

À excepção do extracto aquoso de folhas de *H. italicum*, todos os restantes podem ser considerados fracamente citotóxicos, podendo ser consumidos sob a forma de “chás”. O efeito citotóxico dos extractos podem ser classificados na seguinte ordem *H. italicum* > *S. impressa* > *S. virgaurea*. A avaliação da viabilidade celular permitiu também determinar uma concentração não tóxica de extracto aquoso para prosseguir os estudos com células Caco-2.

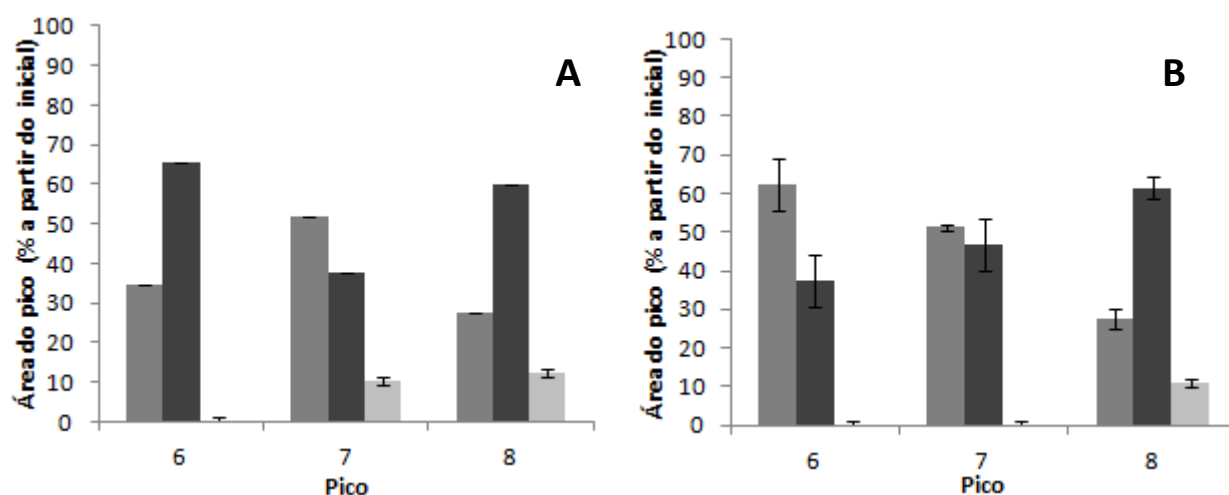
**Tabela 11** - Citotoxicidade dos extractos aquosos de *H. italicum*, *S. impressa* e *S. virgaurea* em células HeLa e Caco-2. Valores de IC<sub>50</sub> (mg/mL) ± d.p. de 2 replicados

		HeLa	Caco-2
<b><i>Helichrysum italicum</i></b>	Folhas	0,72 ± 0,08	0,09 ± 0,01
	Flores	0,69 ± 0,03	0,19 ± 0,03
<b><i>Santolina impressa</i></b>	Folhas	-----	1,48 ± 0,16
	Flores	-----	1,21 ± 0,15
<b><i>Solidago virgaurea</i></b>	Folhas	> 1,0	> 2,0
	Flores	> 1,0	> 2,0

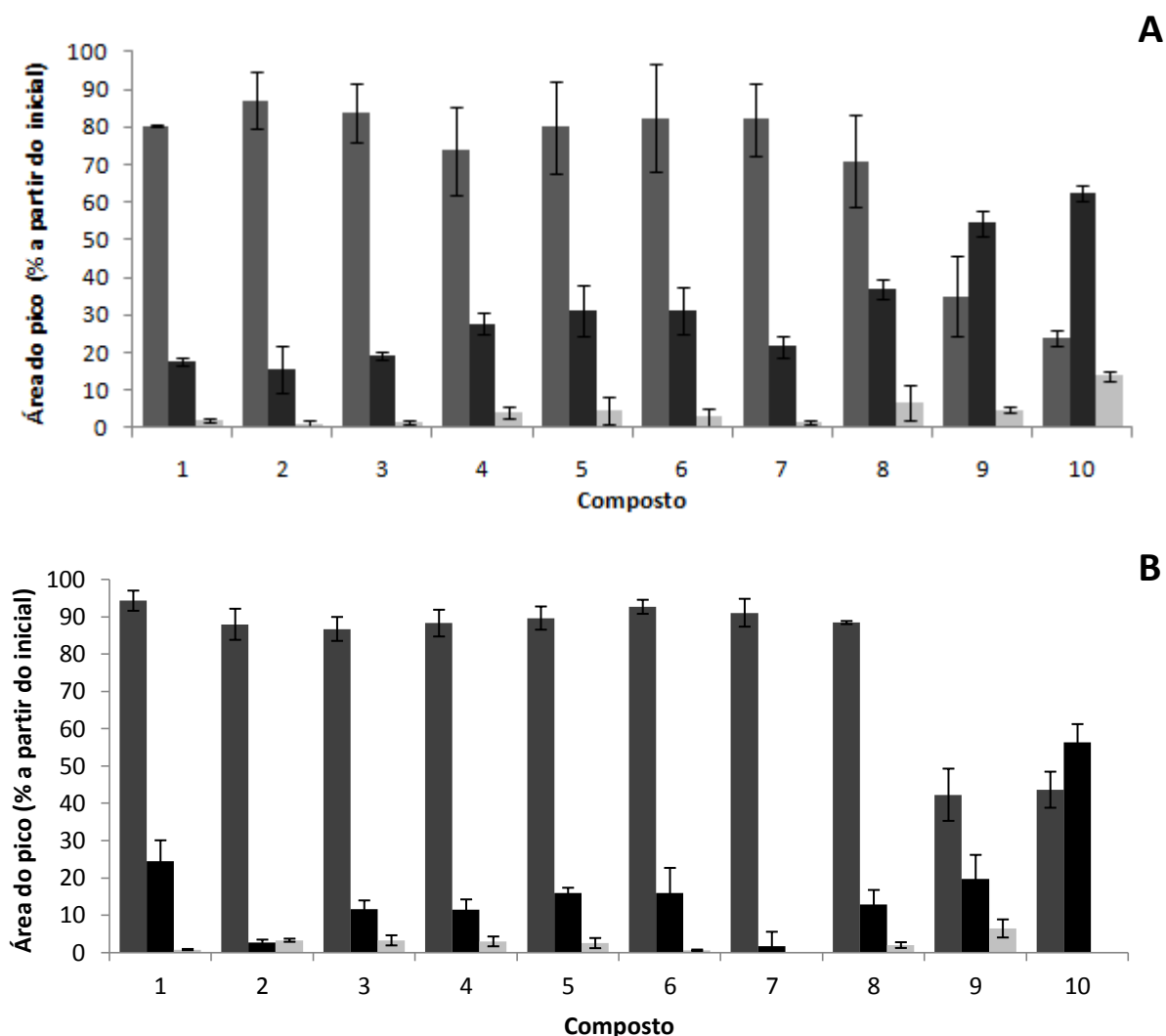
## 5. Biodisponibilidade de Compostos dos Extractos Aquosos de *Helichrysum italicum* e *Solidago virgaurea*

Após o estudo da digestão nos sucos gástrico e pancreático, é necessário perceber se os compostos são metabolizados e/ou absorvidos pelas células intestinais. Este tipo de estudo é um passo importante na pré-formulação de novos fármacos. As células Caco-2 são geralmente usadas como modelo para estudos de biodisponibilidade e transporte através da membrana. Para isso as células são colocadas a crescer em membranas microporosas em divisões com duas câmaras *Transwell*, que mimetizam um pólo basal e um pólo apical. As células diferenciam-se em enterócitos com todas as características de células epiteliais normais, nomeadamente microvilosidades e *tight junctions* (Pinto *et al.*, 1983 citado em Garcia, Flowers & Cook, 1995). O estudo do transporte através da membrana é efectuado das células do pólo apical para o pólo basal. Durante o tempo do ensaio vai-se confirmando pelo ensaio MTT que as células se mantêm viáveis.

Nas Figuras 19A e 19B estão representadas as variações na área dos picos dos compostos presentes nos extractos aquosos de caules/folhas e flores de *H. italicum*, respectivamente. No perfil cromatográfico destes extractos apenas é possível detectar três picos. Para se realizar o ensaio numa concentração de extracto não-tóxica para células Caco-2, foram utilizadas concentrações muito baixas de extracto (0,01 mg/mL) o que impossibilitou uma melhor detecção de compostos por HPLC-DAD. Nas Figuras 20A e 20B estão representadas as variações na área dos picos dos compostos presentes nos extractos aquosos de caules/folhas e flores de *S. virgaurea* numa concentração de 1 mg/mL, não tóxica para células Caco-2, o que já permite uma melhor resolução por HPLC-DAD.



**Figura 19** - Variação na área dos picos dos compostos presentes no extracto aquoso de caules/folhas (A) e de flores (B) de *Helichrysum italicum* após 6 horas na presença de células Caco-2. Áreas representadas em % em relação à área inicial. Pólos Apical; ■ Baso-lateral; ■ Células ■



**Figura 20** - Variação na área dos picos dos compostos presentes no extracto aquoso de caules/folhas (A) e de flores (B) de *Solidago virgaurea* após 6 horas na presença de células Caco-2. Áreas representadas em % em relação à área inicial. Pólos Apical; Baso-lateral; Células

Quando foram analisados os extractos celulares ao fim de seis horas de ensaio (tempo estimado para a digestão intestinal *in vivo*), verificou-se, de um modo geral, que os compostos com maior tempo de retenção são encontrados em maior percentagem no lado basal da câmara e no interior das células. Quanto menor a polaridade (maior o tempo de retenção) de um composto, maior a permeabilidade desse composto através da membrana, sugerindo que não necessita de transportadores específicos. Segundo Kern *et al.* (2003), os hidroxicinamatos (derivados de ácido cafeíco) são metabolizados pelas células Caco-2 por reacções de hidrólise, glucuronidação, sulfatação e O-metilação. Estes compostos podem ainda ser metabolizados pela flora intestinal, no entanto a sua permeabilidade é muito reduzida, ocorrendo principalmente por difusão paracelular (Konishi & Kobayashi, 2004a).

No presente estudo verificou-se que apesar de a maior percentagem de hidroxycinamatos se encontrar no lado apical da membrana, a eficiência de absorção dos ácidos cafeícos é superior à do ácido clorogénico, o que está de acordo com os resultados obtidos por Konishi & Kobayashi (2004a). Estes autores referem a existência de um transportador de ácidos monocarboxílicos (MCT, do inglês *monocarboxylic acid transporter*) responsável pela permeação de ácidos fenólicos e hidroxycinamatos de estrutura simples, como o ácido ferúlico e caféico. O transportador MTC é responsável pela permeação em células Caco-2 dos compostos que resultam do metabolismo dos hidroxycinamatos. A ausência de flora intestinal em estudos *in vitro* faz com que não seja detectável a permeabilidade dos compostos na barreira intestinal. Em estudos *in vivo*, a flora intestinal exibe actividade esterásica, deste modo, o ácido clorogénico que não é transportado pelo MCT, pode ser hidrolisado por uma esterase, dando origem a ácido caféico, que de acordo com Konishi & Kobayashi (2004b) pode ser transportado via MCT.

Em geral, os flavonóides são absorvidos após transporte por difusão passiva e em alguns casos mecanismos de efluxo (Tian, Yang, Yang & Wang, 2008). Pela análise dos gráficos das Figuras 22-25, observa-se que de um modo geral existe uma maior acumulação de flavonóides no interior das células do que de derivados de ácido caféico. Esta observação está de acordo com o estudo de Tian *et al.* (2008). Segundo estes autores, os mecanismos de permeabilidade são bastante complexos e a acumulação destes compostos no interior das células poderá estar relacionado com a sua estrutura.

O ensaio de biodisponibilidade dos compostos do extracto aquoso de *S. impressa* não foi realizado porque por motivos alheios à nossa vontade não foi possível cultivar as células Caco-2.

## **6. Morfologia, Anatomia e Distribuição das Estruturas Secretoras em *Helichrysum italicum*, *Santolina impressa* e *Solidago virgaurea***

As três espécies da família Asteraceae estudadas (*H. italicum*, *S. impressa* e *S. virgaurea*), apresentam nos órgãos aéreos tricomas glandulares bisseriados ocorrendo também canais secretores em *S. impressa* e *S. virgaurea*.

*Helichrysum italicum* é um caméfito aromático bem conhecido nos habitats mediterrânicos pelas suas flores amarelas (Est. I, Figuras 1 e 2) e pelo intenso cheiro a caril. As folhas lineares com margens revolutas apresentam um denso indumento lanoso-tomentoso que lhes confere uma cor verde-cinza característica (Est. I, Figura 3 e 4). As margens revolutas da folha escondem quase por completo a superfície abaxial, deste modo só a superfície adaxial e a superfície abaxial da nervura

central ficam em contacto com o ambiente externo apesar de cobertas por tricomas não glandulares. O indumento que ocorre nas folhas é semelhante ao que cobre toda a planta, mesmo os capítulos antes da antese, que estão envolvidos por brácteas involucrais muito pilosas (Est. I, Figura 5). Os capítulos são constituídos por flores tubulosas (Est. I, Figura 6), que apresentam um pequeno papilho (Est. I, Figura 7).

A secção transversal da folha mostra que as margens da folha flectindo para baixo definem com a nervura central duas câmaras (criptas) que confinam os tricomas glandulares e os estomas (setas), estruturas que se formam ao a partir de iniciais da protoderme abaxial da folha (Est. II, Figura 1-3). A superfície adaxial da folha está revestida por indumento constituído por tricomas de cobertura filiformes, longos e de secção mais ou menos circular. Estes tricomas unisseriados e multicelulares revestem todos os órgãos aéreos de *H. italicum*, ocorrendo na superfície abaxial da folha, dispersos entre os tricomas glandulares (Est. II, Figuras 1 e 2) e revestem para além disso todos os órgãos aéreos de *H. italicum*. Os tricomas glandulares confinados nas criptas foliares são bisseriados e podem ser subdivididos em dois tipos diferentes de acordo com as suas dimensões relativas (Est. II, Figuras 2,3 e 5; Est. III, Figuras 1-4; Est. IV, Figuras 1-12). Os tricomas bisseriados de maiores dimensões (tipo I) são constituídos por um pedículo com três pares de células e uma cabeça glandular também com três pares de células, sendo as apicais hipertrofiadas com uma altura de 2 a 3 vezes maior que as outras células glandulares (Est. II, Figuras 2-6, Est. III, Figuras 1-5; Est. IV, Figuras 1, 2, 5, 6, 8, 9, 11, 13). O secretado é nestes tricomas acumulado num grande espaço subcuticular formado por destacamento da cutícula da parede externa das células apicais (Est. III, Figura 4, Est. IV, Figuras 1, 2, 5, 8, 9, 11, 12). A eliminação do secretado para o exterior ocorre por ruptura da cutícula (Est. II, Figura 4, seta; Est. IV, Figura 6).

Os tricomas bisseriados de menor dimensão (tipo II) são constituídos por 1 par de células de pedículo e dois pares de células de cabeça glandular (Est. IV, Figuras 3 e 4). Aparentemente há um espaço subcuticular muito pequeno, acumulando-se o secretado preferencialmente nos vacúolos. Algumas imagens sugerem, que o secretado contido no diminuto espaço subcuticular, poderá ser eliminado por poros cuticulares nas paredes externas das células apicais (Est. IV, Figuras 3 e 10, setas; Est. V, Figuras 2 e 3).

Os estomas situados na epiderme abaxial da folha e confinados às criptas, elevam-se acima do plano da epiderme e distribuem-se entre os tricomas (Est. II, Figuras 2 e 3, setas; Est. III, Figuras 1 e 3, setas).

*Santolina impressa* é um caméfito aromático endêmico em Portugal em locais arenosos, geralmente ao longo da costa marítima, numa região compreendida entre o Rio Sado e o Cabo de Sines (Est. VI, Figura 1). Identifica-se com facilidade por ter folhas multilobadas, tomentosas de cor verde acinzentado (Est. VI, Figuras 3 e 4) e capítulos pequenos e pedunculados (Est. VI, Figura 2). As flores tubulosas são amarelas, geralmente hermafroditas, muito glandulosas e sem papilho (Est. VI, Figuras 5, 6). Em microscopia de varrimento observa-se que as folhas subcilíndricas são multilobadas, com lobos estritamente imbrincados, apresentando um denso indumento lanoso-tomentoso (Est. VII, Figura 1). O indumento é do tipo misto, constituído por tricomas de cobertura alongados, em forma de fita e por tricomas glandulares bisseriados localizados a nível das câmaras, estruturas que se formam entre dois lobos sucessivos (Est. VII, Figuras 2-6; Est. IX, Figuras 1-3). Os tricomas não glandulares devido às suas dimensões emergem dos sulcos e estendem-se à superfície da folha, revestindo-a (Est. VII, Figuras 1-4; Est. XI, Figuras 1-3). Os caules e os pedúnculos dos capítulos apresentam o mesmo tipo de indumento tendo por isso o mesmo tom verde-acinzentado (Est. VIII, Figuras 2, 3).

Os tricomas glandulares bisseriados são quase isodiamétricos nas folhas e no ápice das pétalas das flores tubulosas. São constituídos por uma cabeça glandular com 3-4 pares de células e um pedículo com dois pares de células (Est. VIII, Figuras 5 e 6). Os tricomas glandulares no tubo da corola são mais estreitos e mais compridos e encontram-se dispersos entre os tricomas de cobertura (Est. VIII, Figura 4). Em qualquer dos casos as células apicais da cabeça glandular são maiores e a cutícula ao destacar-se das camadas da parede subjacente dá origem a um grande espaço subcuticular onde o secretado se acumula (Est. IX, Figuras 4 e 5; Est. XI, Figura 2).

Para além dos tricomas glandulares, as folhas apresentam um canal secretor por lobo e dois canais secretores associados ao feixe vascular central (Est. VII, Figuras 2, 4, 5; Est. IX, Figuras 1-3; Est. X, Figura 3). O caule e o pedúnculo da inflorescência apresentam também canais secretores na proximidade dos feixes vasculares (Est. VIII, Figura 2). Os canais possuem delimitando o lúmen um epitélio constituído por uma camada de células glandulares e uma bainha envolvente formada por uma camada de células hipertrofiadas (Est. IX, Figura 6).

*Solidago virgaurea* é hemicriptófito subarrosetado que ocorre em sítios secos frequentemente arenosos (Est. XII, Figura 1). Possui folhas oblongo-lanceoladas mais ou menos agudas, dentadas ou serradas (Est. XII, Figuras 3, 5 e 6), com margens ciliadas, devido à presença de tricomas não glandulares (Est. XII, Figura 6). A superfície superior das folhas é glabrescente com tricomas glandulares ao longo da nervura central (Est. XII, Figura 6; Est. XIII, Figura 3) e a superfície inferior é pubescente com tricomas não glandulares multicelulares, em forma de chicote, chicote (flagiliformes), localizadas especialmente ao longo da nervura e na margem (Est. XIII, Figura 2). As

folhas jovens possuem um grande número de tricomas glandulares (Est. XII, Figura 3, 4; Est. XIII, Figura 1), cuja densidade (frequência por unidade de área) diminui à medida que a folha expande (Est. XII, Figuras 5-7; Est. XIII, Figuras 2-5).

As inflorescências são fasciculadas, sendo os capítulos numerosos, pequenos e de cor amarela (Est. XII, Figura 2). Os capítulos são pilosos, com brácteas involucrais com tricomas glandulares nas margens e ao longo da nervura (Est. XIV, Figuras 4 e 5). As flores externas são liguladas, femininas e glabras (Est. XII, Figura 2; Est. XIV, Figura 2) apenas com papilas nas margens dos “três dentes” apicais, que correspondem a três pétalas unidas. As flores internas são tubulosas e hermafroditas (Est. XII, Figuras 8,9) e apresentam tricomas glandulares (Est. XII, figura 10; Est. XIV, Figuras 1, 3 e 6). Os tricomas glandulares são de pequena dimensão e bisseriados. Nas folhas apresentam cabeças glandulares constituídas por quatro pares de células e pedúnculos com um a dois pares de células (Est. XIII, Figuras 3 e 6; Est. XV, Figuras 7 e 8; Est. XIV, Figuras 4 e 5).

Os tricomas glandulares, no ápice da flor tubulosa, são semelhantes aos das brácteas e folhas, mas à medida que nos aproximamos da extremidade distal do tubo da corola o pedículo alonga-se, sendo constituído por 3-4 pares de células, aumentando também a sua frequência por unidade de área (Est. XIV, Figuras 1, 3 e 6). O papilho é constituído por 1-2 séries de pêlos mais ou menos iguais (Est. XII, Figura 10).

Os tricomas glandulares diferenciam-se muito precocemente durante a ontogenia dos órgãos (Est. XV, Figura 1), tendo origem numa célula hipertrofiada da protoderme, que sofre uma primeira divisão anticlinal que define imediatamente a sua estrutura bisseriada (Est. XV, Figura 5). As duas células formadas sofrem depois sucessivas divisões periclinais até darem origem aos tricomas maduros constituídos por 10-16 células (Est. XV, Figuras 6-9).

Para além dos tricomas glandulares, as folhas apresentam canais secretores na proximidade dos feixes vasculares, associados ao floema (Est. XIII, Figura 4, Est. XV, Figura 3). Os canais diferenciam-se também muito cedo durante a ontogenia dos órgãos aparentemente por um processo de esquizogenia (Est. XV, Figuras 2 e 4).

Os tricomas glandulares multicelulares bisseriados são característicos das Asteraceae (Metcalf & Chalk, 1950), mas dado o grande número de espécies, são ainda escassos estudos detalhados nessas estruturas secretoras. A morfologia externa dos tricomas glandulares observados em *Helichrysum italicum*, *Santolina impressa* e *Solidago virgaurea* é semelhante à descrita em órgãos aéreos de outras espécies de Asteraceae, nomeadamente em *Achillea millefolium* (Figueiredo & Pais, 1994), *Artemisia campestris* (Ascensão & Pais, 1987), *A. annua* (Duke & Paul, 1993; Ferreira & Janick, 1995), *Helichrysum aureonitens* (Afolayan & Meyer, 1995), *H. stoechas* (Ascensão et al., 2001), *Santolina leucantha* (Pagni, 1995), *Stevia rebaudiana* (Monteiro, Castro, Viveiros & Mahlberg, 2001) e

*Sigesbeckia jurollensis* (Heinrich *et al.*, 2002). De um modo geral os pedículos destes tricomas são formados por duas células contudo, nas três espécies agora estudadas, observam-se pedículos mais longos nos tricomas que ocorrem no tubo da corola das flores tubulosas, que apresentam vários pares de células. Por outro lado, em *Helichrysum italicum* observam-se dois tipos de tricomas bisseriados (tipo I e tipo II), que diferem entre si pelas dimensões (o que reflecte o número de células constituintes), os compostos produzidos e modo de eliminação do secretado. Também em *Inula viscosa*, Werker e Fahn (1981) referem a ocorrência de dois tipos de tricomas bisseriados de dimensão diferente, produzindo e eliminando secretados distintos.

Os tricomas glandulares destas três espécies de Asteraceae diferenciam-se numa fase precoce do desenvolvimento dos órgãos vegetativos e florais, sendo desde essa altura estabelecido o seu número final. Seguem assim uma linha evolutiva, em que há uma diminuição do número de tricomas por unidade de área, á medida que o órgão cresce. Esse decréscimo da densidade de tricomas está também intimamente relacionado com o envelhecimento e degenerescência dos próprios tricomas no término da sua actividade secretora. Resultados idênticos foram referidos nos estudos citados no parágrafo anterior.

Em *Helichrysum italicum* os tricomas glandulares estão confinados a criptas da superfície abaxial folha, contrariamente ao que sucede na maioria das outras espécies de Asteraceae estudadas, em que ocorrem nas duas superfícies foliares, embora sejam mais abundantes na superfície adaxial, onde muitas vezes estão aprofundados em depressões da epiderme. Os tricomas de cobertura presentes nos vários órgãos de *Helichrysum italicum* são filamentosos como em *H. stoechas* (Ascensão *et al.*, 2001); em forma de fita em *Santolina impressa*, como em outras espécies deste género; em chicote (flangiliformes) em *Solidago virgaurea*, como em *Inula viscosa* (Werker & Fahn, 1981) e *Helichrysum aureonitens* (Afolayan & Meyer, 1995).

A pubescência é um aspecto comum em plantas superiores, a que se atribuiu desde muito cedo um papel adaptativo. De um modo geral pensa-se que os tricomas possam ter um papel importante nas relações hídricas das folhas, em especial em ambientes áridos sujeitos a elevada radiação e temperatura. As espécies estudadas neste trabalho ocorrem em regiões de clima mediterrâneo e em locais arenosos, podendo o indumento desempenhar um papel relevante na economia de água e na protecção dos tecidos clorofilinos contra á intensa radiação e elevadas temperaturas de Verão. Para além disso a pubescência, nomeadamente a presença de tricomas glandulares, poderá conferir uma protecção mais eficiente contra a herbivoria. Os tricomas de cobertura por si só formam uma barreira física, que é reforçada pela presença de tricomas glandulares, que ao eliminarem produtos do metabolismo secundário, constituem uma barreira química protectora que defende as plantas do ataque de herbívoros de e de agentes patogénicos.



A morfologia e distribuição dos canais secretores agora descritos em *Santolina impressa* e em *Solidago virgaurea* são semelhantes aos observados em outras Asteraceae, nomeadamente em *Artemisia campestris* (Ascensão & Pais, 1988), *Baccharis dracunculifolia* (Oliveira & Bastos, 1999), *Santolina insularis* (Sacchetti *et al.*, 1997) e em diversas espécies do género *Solidago* (Anderson & Creech, 1975). O processo de formação dos canais secretores por esquizogenia é também comum nas Asteraceae (Andreucci, Ciccarelli, Desideri & Pagni, 2008; Oliveira & Bastos, 1999).

## 7. Caracterização Histoquímica dos Secretados de *Helichrysum italicum*, *Santolina impressa* e *Solidago virgaurea*

### 7.1. Em Luz Visível

Nos órgãos vegetativos e florais de *Helichrysum italicum*, *Santolina impressa* e *Solidago virgaurea* os tricomas glandulares completamente diferenciados possuem, como já foi referido, um pedículo bisseriado de altura variável e uma cabeça glandular também bisseriada com 8 – 12 células. As células apicais são desprovidas de cloroplastos, ao contrário das restantes células da cabeça glandular. O secretado é nas três espécies incolor, acumulando-se num espaço subcuticular, que se desenvolve ao longo das paredes externas das células apicais da cabeça glandular. Em *Helichrysum italicum* os tricomas do tipo II possuem um espaço subcuticular diminuto, enquanto os do tipo I exibem, tal como nas outras duas espécies estudadas, um grande espaço subcuticular (Est. IV, Figuras 1-3; Est. V, Figura 1; Est. X, Figuras 1, 2, Est. XI, Figuras 1, 2; Est. XVI, Figuras 1, 15).

Em secções das folhas tratadas com o lisocromo Vermelho de Sudão IV, para detecção de lípidos totais, observa-se em *Helichrysum italicum*, nos tricomas do tipo I, uma reacção positiva no secretado contido no espaço subcuticular (Est. IV, Figura 5), ou que após rotura da cutícula, se acumulou por escorrência ao longo do pedículo do tricoma (Est. IV, Figura 6), tal como sucede em *S. impressa* (resultado não mostrado). Nos tricomas de tipo II de *H. italicum* é predominantemente o secretado contido nos vacúolos que cora de vermelho (Est. IV, Figura 4), à semelhança do que sucede nos tricomas de *S. virgaurea* (Est. XVI, Figura 3). Para além disso, cora intensamente de vermelho a cutícula que cobre a epiderme das folhas de *H. italicum* (Est. IV, Figura 7), e de *S. impressa* (Est. X, Figuras 3, 4), assim como o secretado contido no lúmen dos canais desta última espécie e de *S. virgaurea* (Est. X, Figura 3; Est. XVI, Figura 2).

O Tetróxido de Ósmio, para lípidos dos insaturados, cora de negro as células apicais dos tricomas glandulares do tipo I de *H. italicum* e o secretado contido no espaço subcuticular (Est. IV, Figura 8), assim como o secretado acumulado na câmara subcuticular dos tricomas de *S. virgaurea*

(Est. XVI, Figura 6). Também o secretado nas células epiteliais dos canais de *S. impressa* e de *S. virgaurea* cora de negro com o Tetróxido de Ósmio (Est. X, Figura 7; Est. XVI, Figura 5).

Com o Sulfato Azul do Nilo, para distinguir lípidos ácidos de neutros, o secretado no espaço subcuticular de *S. impressa* (Est. X, Figura 6) e o acumulado por escorrência na superfície da folha de *S. virgaurea* (Est. XVI, Figura 4) cora de vermelho. Também o secretado contido no lúmen dos canais *S. impressa* cora intensamente de vermelho (Est. X, Figura 5), assim como o de *S. virgaurea* (não mostrado).

Nas três espécies em estudo, o secretado dos tricomas cora predominantemente de azul com o Reagente de Nadi, para distinguir óleos essenciais de resinas (Est. IV, Figuras 9, 10; Est. X, Figura 8; Est. XVI, Figura 8), embora nas células da cabeça glandular dos tricomas de *S. virgaurea* se observem algumas gotículas de cor violeta (Est. XVI, Figura 8). Já o secretado acumulado no lúmen dos canais cora, com este reagente, de púrpura em *S. impressa* (Est. X, Figura 10) e de roxo escuro em *S. virgaurea* (Est. XVI, Figura 7).

Com o Cloreto de Ferro III e o Dicromato de Potássio, para detecção de compostos fenólicos, só o conteúdo das células apicais dos tricomas do tipo I de *H. italicum* cora respectivamente de negro ou de castanho (Est. IV, Figuras 11,12), ou algum conteúdo dos vacúolos dos tricomas glandulares e não glandulares de *S. virgaurea* (Est. XVI, Figuras 9-11). Contudo, o secretado acumulado no espaço subcuticular dos tricomas, das três Asteraceae em estudo, deu reacção negativa com estes reagentes, embora o conteúdo das células do epitélio glandular dos canais de *S. impressa* e das células epidérmicas da folha reagissem positivamente (Est. X, Figuras 11,12). Reacções idênticas foram observadas em *S. virgaurea* (resultados não mostrados).

O Vermelho de Ruténio, para pectinas e mucilagens vegetais, não cora nas três espécies nem o secretado dos tricomas nem o dos canais (Est. IV, Figuras 13-15; Est. XVI, Figura 12). Contudo, cora intensamente as paredes dos tricomas de cobertura de *H. italicum* (Est. IV, Figuras 14, 15), as paredes da célula apical dos tricomas em chicote de *S. virgaurea* (Est. XVI, Figura 13), as paredes de tecidos como o colênquima e a epiderme, à excepção da parede externa das células deste último tecido (Est. XVI, Figura 14).

As reacções controlo realizadas para cada teste deram resultados negativos.

## 7.2. Em Luz Ultravioleta e na Banda do Azul

Em *H. italicum*, o secretado acumulado no grande espaço subcuticular dos tricomas do tipo I e o contido das células apicais dos tricomas do tipo I e II emitem em UV, uma intensa autofluorescência azul (Est. V, Figuras 2, 3) e autofluorescem de amarelo-esverdeado em luz azul

(Est. V, Figura 1). À semelhança do que se observa em *H. italicum*, também em *S. impressa* e *S. virgaurea* se verifica o mesmo tipo de autofluorescência, quer do secretado produzido pelos tricomas quer do biossintetizado pelas células glandulares dos canais (Est. XI, Figuras 1-7; Est. XVI, Figura 15). Nos tricomas glandulares de *Solidago virgaurea* é bem visível que as células apicais são desprovidas de cloroplastos, ao contrário dos restantes pares de células da cabeça glandular, que autofluorescem de vermelho em luz azul devido à presença de clorofila (Est. XVI, Figura 15).

Em secções das folhas, os tricomas do tipo I e II de *H. italicum*, após a aplicação de Tricloreto de Alumínio, emitem uma intensa fluorescência secundária amarela ou amarela-esverdeada em UV (Est. V, Figuras 4, 5). Reacções idênticas são também observadas nos secretados dos tricomas e canais de *S. impressa* e *S. virgaurea* (resultados não mostrados).

Apesar da pouca especificidade de alguns testes histoquímicos, a informação obtida por cruzamento dos resultados dos diferentes testes permite pôr em evidência os grupos de compostos químicos maioritariamente presentes nos secretados.

A coloração obtida com o Vermelho de Sudão IV revela a presença de compostos de natureza lipídica. A coloração azul de algum secretado dos tricomas glandulares de *S. virgaurea*, obtida por acção da oxazina do Sulfato Azul do Nilo, leva a admitir a presença de lípidos ácidos. Contudo, esta coloração é inespecífica, não indicando apenas a existência de lípidos ácidos, já que a oxazina ao reagir com compostos basófilos dá resultados semelhantes. Mas a coloração vermelha desenvolvida com o secretado dos canais de *S. impressa* e de *S. virgaurea* e com uma fracção do secretado dos tricomas da última espécie leva-nos a admitir que o secretado é constituído maioritariamente por compostos lipídicos neutros.

A coloração negra observada nas células glandulares dos tricomas e dos canais após tratamento com o Tetróxido de Ósmio revela a presença de compostos ricos em duplas ligações, que eventualmente poderão ser ácidos gordos insaturados.

Os terpenóides são um grupo de compostos lipofílicos, que têm em comum com os lípidos o facto de serem solúveis em solventes orgânicos, tal propriedade permitem que reajam positivamente aos testes de caracterização geral de lípidos (Sudões), não sendo possível com estes testes distingui-los de outras inclusões lipídicas. A utilização do Reagente de Nadi permite esta distinção por alteração da cor com variação do pH. A pH neutro os óleos essenciais coram de azul e a pH ácido os ácidos resínicos coram de vermelho escuro. Os resultados obtidos no secretado de *H. italicum* sugerem um óleo essencial, mas os secretados dos tricomas e dos canais de *S. impressa* e de *S. virgaurea* indicam a presença de uma oleorresina, o que está de acordo com os resultados previamente obtidos com o Azul Sulfato do Nilo.

A inexistência de pectinas e de mucilagens nos secretados das três espécies é revelada pela reacção negativa ao Vermelho de Ruténio. Com este teste apenas algumas paredes reagiram positivamente pondo em relevo a natureza pecto-celulósica dessas paredes.

A reacção do secretado, acumulado em algumas células glandulares dos tricomas e dos canais, com o Cloreto de Ferro III e Dicromato de Potássio revelam a presença de compostos fenólicos. Idêntica conclusão se pode retirar em relação aos conteúdos das células da epiderme que reagiram positivamente a estes reagentes em *S. impressa* e de *S. virgaurea*.

Estes resultados foram confirmados em microscopia de fluorescência, pela autofluorescência azul emitida em UV e amarela-esverdeada emitida em luz azul, tanto a nível das células anteriormente referidas como pelo secretado acumulado no espaço subcuticular.

A fluorescência secundária amarela-esverdeada induzida pelo Tricloreto de Alumínio e observada em UV indica que alguns dos compostos fenólicos serão flavonóides.

A interpretação dos resultados obtidos nos teste histoquímicos efectuados para a caracterização química do secretado dos tricomas de *H. italicum* sugerem um óleo essencial rico em compostos fenólicos, o secretado das outras duas espécies é uma oleorresina rica também em compostos fenólicos. Quer num caso quer noutro os flavonóides estão presentes sob a forma agliconas.

## V. Estampas

---

## ESTAMPA I

### FOTOGRAFIAS MACROSCÓPICAS DE EXEMPLARES DE *Helichrysum italicum*

Figura 1 - Aspecto geral de um exemplar de *H. italicum* em fase floral.

Figura 2 – Pormenores de um ramo floral.

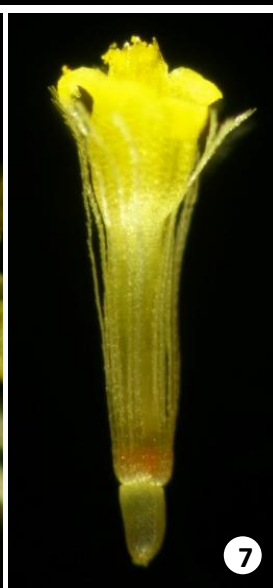
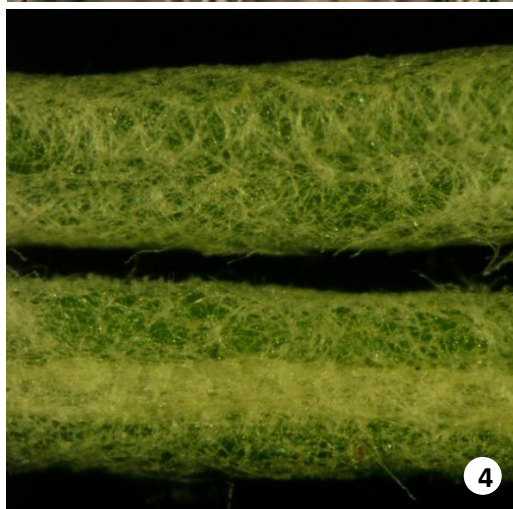
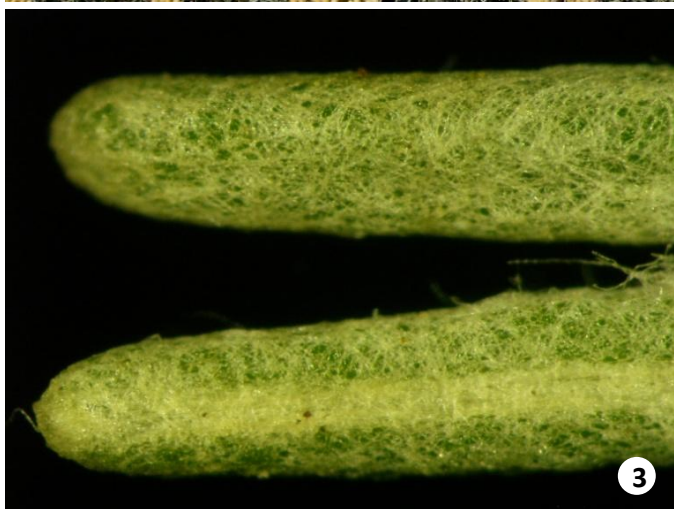
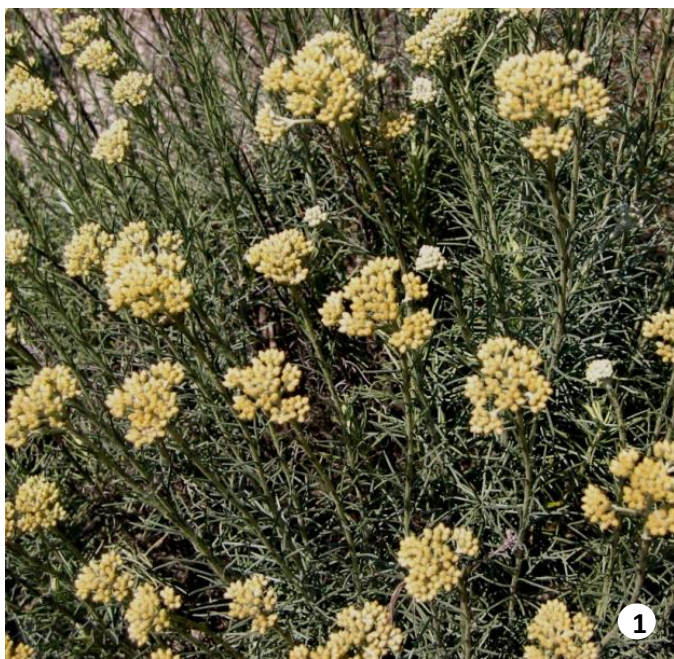
Figuras 3 e 4 – Folhas adultas de *H. italicum* mostrando o denso indumento, que as cobre desde o ápice até à base.

Figura 5 – Invólucros oblongo cilíndricos de capítulos muito jovens evidenciando o denso indumento que cobre as brácteas involucrais e os pedúnculos das inflorescências.

Figura 6 – Botões florais em diferentes estádios de desenvolvimento em capítulos maduros.

Figura 7 – Detalhe da flor tubulosa. Nota-se a presença de papilho.

# ESTAMPA I



## ESTAMPA II

### DISTRIBUIÇÃO E MORFOLOGIA DOS TRICOMAS DE *Helichrysum italicum*

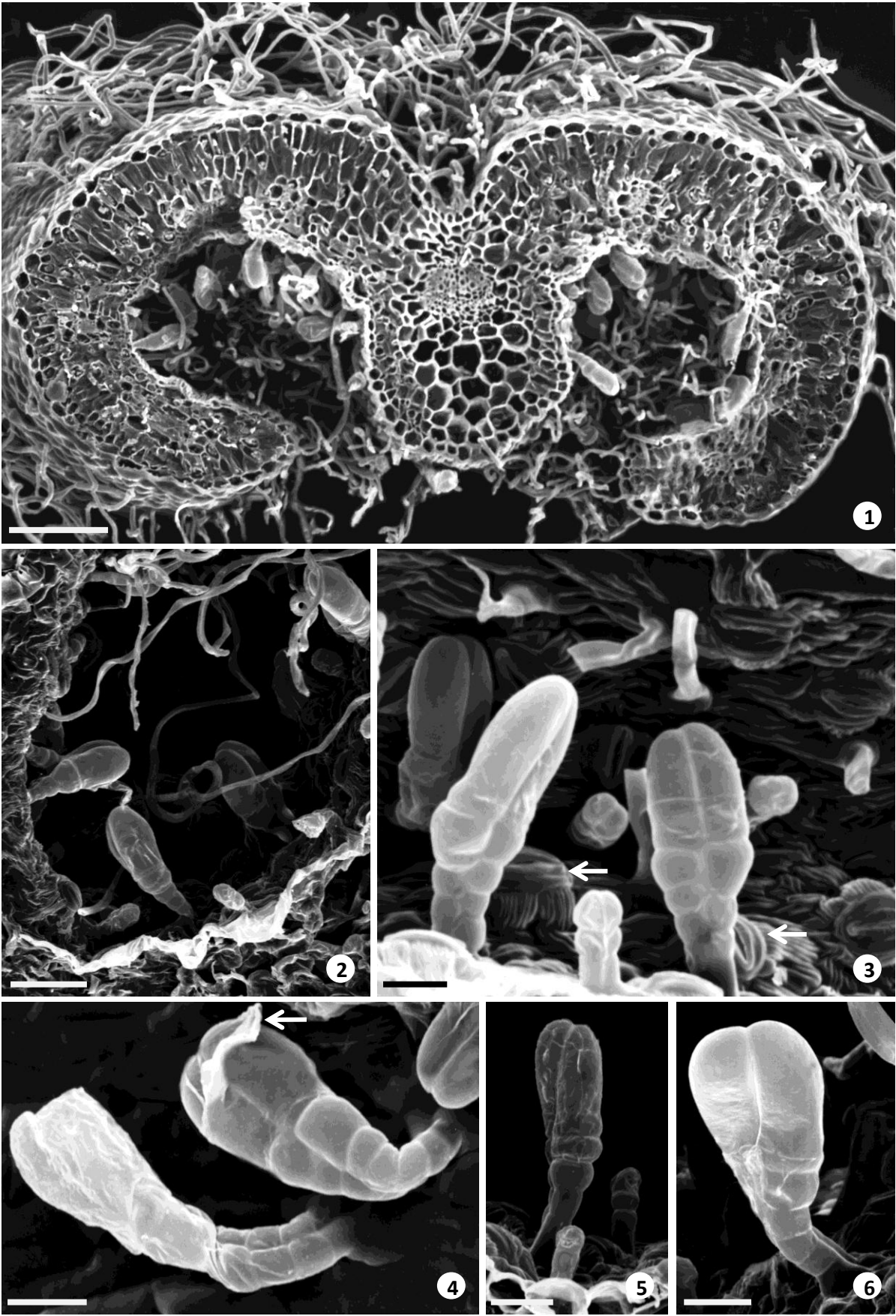
Microfotografias de microscopia electrónica de varrimento de material fixado e seco pelo método do ponto crítico

Figura 1 – Secção transversal de folha jovem. Observam-se numerosos tricomas não glandulares, que cobrem por completo a superfície adaxial da folha. Os tricomas glandulares estão confinados a criptas na superfície abaxial da folha. Dispersos entre os tricomas glandulares ocorrem também numerosos tricomas não glandulares. Barra = 100  $\mu\text{m}$ .

Figura 2 – Pormenor de uma cripta evidenciando os tricomas. Barra = 50  $\mu\text{m}$ .

Figuras 3-6 – Pormenores de tricomas glandulares bisseriados completamente diferenciados e em fase de secreção activa. Na Figura 3 observam também estomas que se elevam acima da epiderme (setas). Na Figura 4 é visível a cutícula que se destacou da parede subadjacente (seta). A Figura 5 evidência que existem duas populações diferentes de tricomas glandulares bisseriados que se diferenciam pelas suas dimensões. Barras = 20  $\mu\text{m}$ .





### ESTAMPA III

#### ANATOMIA DOS TRICOMAS GLANDULARES DE *Helichrysum italicum*

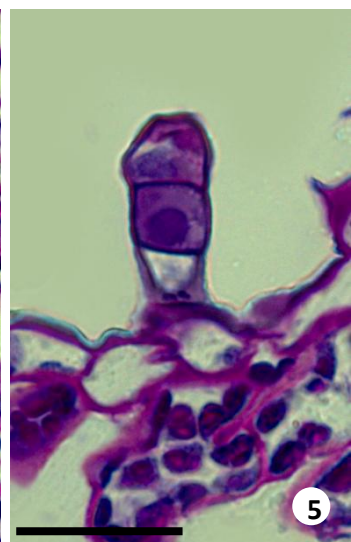
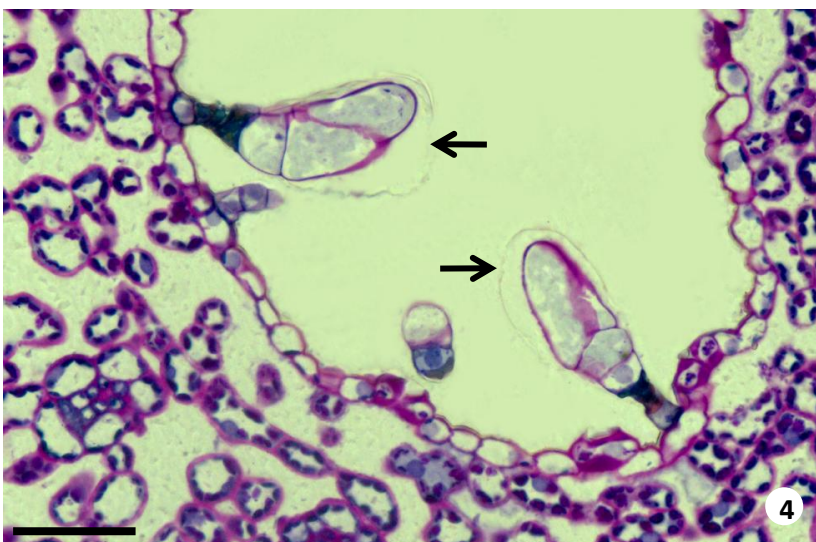
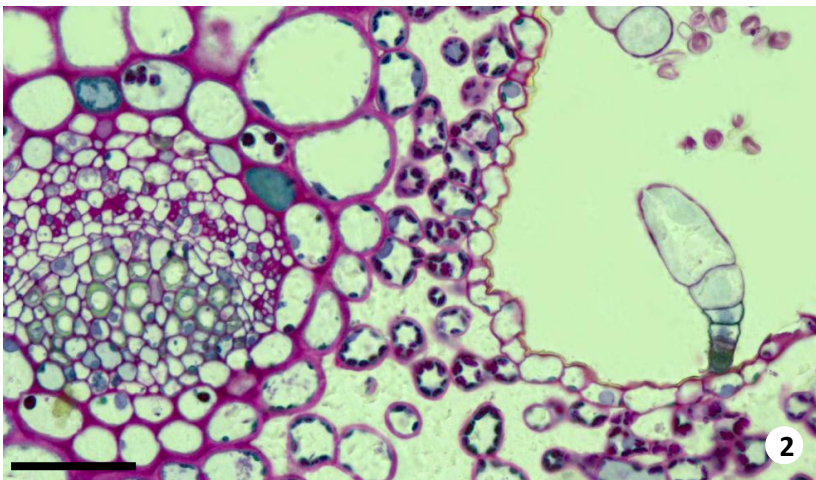
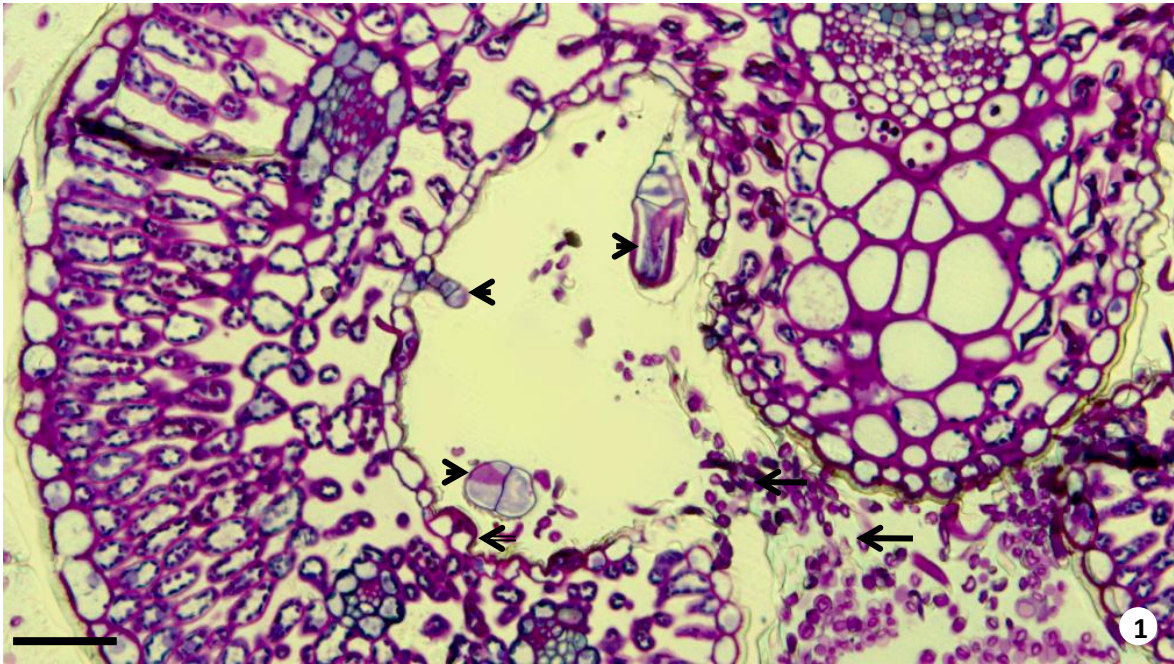
Microfotografias de secções de material fixado e incluído em historesina. Coloração sequencial com Ácido Periódico/Reagente de Schiff (PAS) e Azul de Toluidina O

Figura 1 – Corte transversal de uma folha jovem. Observam-se tricomas glandulares (pontas de seta), tricomas não glandulares (setas) e estomas (setas duplas) na cripta da folha. Barra = 50  $\mu\text{m}$ .

Figuras 2 e 3 – Tricomas glandulares bisseriados do tipo I apresentando um pedículo constituído por três pares de células e uma cabeça glandular também com três pares de células. Na Figura 3 observam-se dois estomas (setas). Barras = 50  $\mu\text{m}$  (2); 20  $\mu\text{m}$  (3).

Figura 4 – Tricomas glandulares bisseriados do tipo I em fase activa de secreção. Observa-se o espaço subcuticular delimitado pela cutícula que se destacou da parede subadjacente (setas) observado de perfil. Barra = 50  $\mu\text{m}$ .

Figura 5 – Tricoma glandular bisseriado do tipo II (visto de perfil) com duas células do pedículo e dois pares de células glandulares. Barra = 20  $\mu\text{m}$ .





## ESTAMPA IV

### CARACTERIZAÇÃO HISTOQUÍMICA DO SECRETADO DOS TRICOMAS GLANDULARES DE *Helichrysum italicum*

Aspectos microscópicos de secções transversais de tricomas em material fresco

Figuras 1-3 – Tricomas glandulares bisseriados em fase de secreção, sem qualquer coloração. Nos tricomas do tipo I observa-se o volumoso espaço subcuticular onde o secretado se encontra acumulado (Figuras 1 e 2). Na Figura 1 é também visível um tricoma bisseriado de pequena dimensão que se encontra ampliado na Figura 3. Barras = 20 µm (1-2); 10 µm (3).

Figura 4 – Tricoma glandular bisseriado do tipo I com material vacuolar corado de laranja. (Coloração: Vermelho de Sudão IV). Barra = 10 µm.

Figuras 5 e 6 – Tricomas glandulares bisseriados de grande dimensão mostrando o volumoso espaço subcuticular onde o secretado se acumula (Figura 5). Na Figura 6, por rotura da cutícula observou-se o secretado que por escorrência se acumulou na superfície do pedículo (seta). O secretado corou de vermelho alaranjado. (Coloração: Vermelho de Sudão IV). Barra = 20 µm.

Figura 7 – Epiderme da folha mostrando a espessa parede celular em que a cutícula se apresenta corada muito intensamente de laranja. [Coloração: Vermelho de Sudão IV]. Barra = 10 µm.

Figura 8 – Tricoma glandular bisseriado do tipo I em que as células da cabeça glandular coraram de negro. Observa-se ainda o volumoso espaço subcuticular onde o secretado acumulado está também corado de negro. [Coloração: Tetróxido de Ósmio]. Barra = 20 µm.

Figura 9 – Tricoma glandular do tipo I com secretado levemente corado de azul. [Coloração: Reagente de Nadi]. Barra = 20 µm.

Figura 10 – Tricomas glandulares bisseriados do tipo II com secretado corado de azul numa pequena câmara subcuticular. [Coloração: Reagente de Nadi]. Barra = 10 µm.

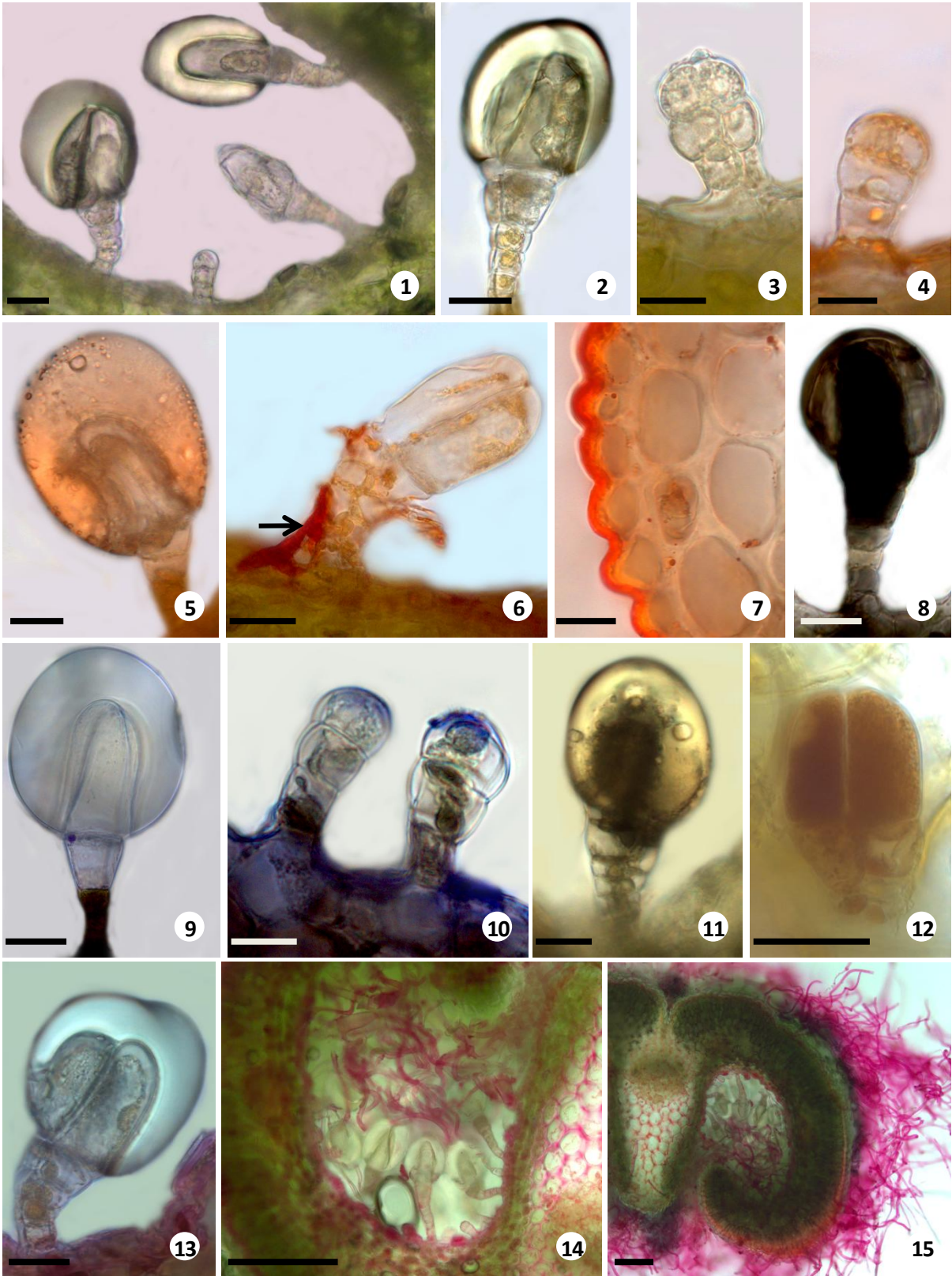
Figura 11 – Tricoma glandular bisseriado do tipo I em que o secretado acumulado nas células glandulares apicais corou de negro. [Coloração: Cloreto de Ferro III]. Barra = 20 µm.

Figura 12 – Tricoma glandular bisseriado do tipo II com células glandulares apicais coradas de laranja. [Coloração: Dicromato de Potássio]. Barra = 20 µm.

Figura 13 – Tricoma glandular bisseriado do tipo I em fase de secreção. O secretado acumulado no espaço subcuticular não corou embora tenha havido reacção na superfície da folha. [Coloração: Vermelho de Ruténio]. Barra = 20 µm.

Figuras 14 e 15 – Os tricomas não glandulares coraram intensamente de rosa quer na superfície adaxial da folha como nas criptas. [Coloração: Vermelho de Ruténio]. Barras = 100 µm.

# ESTAMPA IV



## ESTAMPA V

### CARACTERIZAÇÃO HISTOQUÍMICA DO SECRETADO DOS TRICOMAS GLANDULARES DE *Helichrysum italicum*

Microfotografias de material fresco. Observações em microscopia de fluorescência

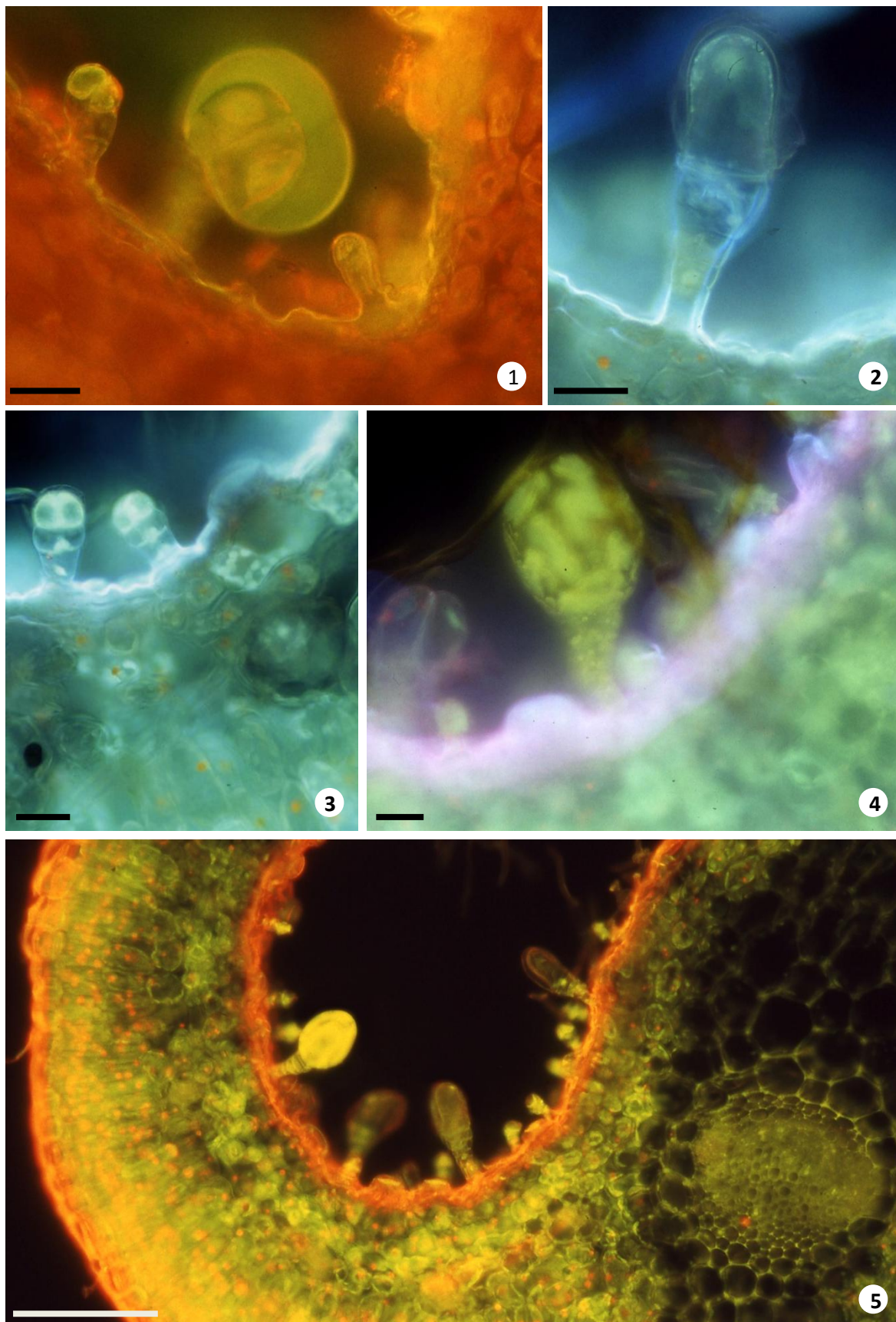
Figuras 1 e 2 – Tricomas glandulares bisseriados do tipo I. Na Figura 1 o secretado acumulado no espaço subcuticular ou nas células apicais da cabeça glandular exibe uma autofluorescência de amarelo-esverdeada em luz azul. As células apicais da cabeça glandular exibem uma autofluorescência de azul-esbranquiçado em luz ultravioleta (Figura 2). Barras = 10  $\mu\text{m}$  (1) e 20  $\mu\text{m}$  (2).

Figura 3 – Tricomas glandulares bisseriados do tipo II observados em luz ultravioleta. As células apicais emitem uma intensa autofluorescência azul-esbranquiçada. Barra = 15  $\mu\text{m}$ .

Figura 4 – Tricoma glandular do tipo I. Observa-se em luz ultravioleta uma intensa fluorescência secundária amarelo-esverdeado no secretado contido no espaço subcuticular. [Coloração: Cloreto de Alumínio]. Barra = 20  $\mu\text{m}$ .

Figura 5 – Tricomas glandulares bisseriados nas criptas da superfície abaxial da folha. Observa-se em luz azul uma intensa fluorescência secundária amarelo-esverdeado no secretado contido no espaço subcuticular dos tricomas do tipo I (seta) e nas células glandulares dos tricomas do tipo II. [Coloração: Cloreto de Alumínio]. Barra = 100  $\mu\text{m}$ .





## ESTAMPA VI

### FOTOGRAFIAS MACROSCÓPICAS DE EXEMPLARES DE *Santolina impressa*

Figura 1 – Aspecto geral de um exemplar de *S. impressa* em fase floral

Figura 2 – Pormenor dos capítulos.

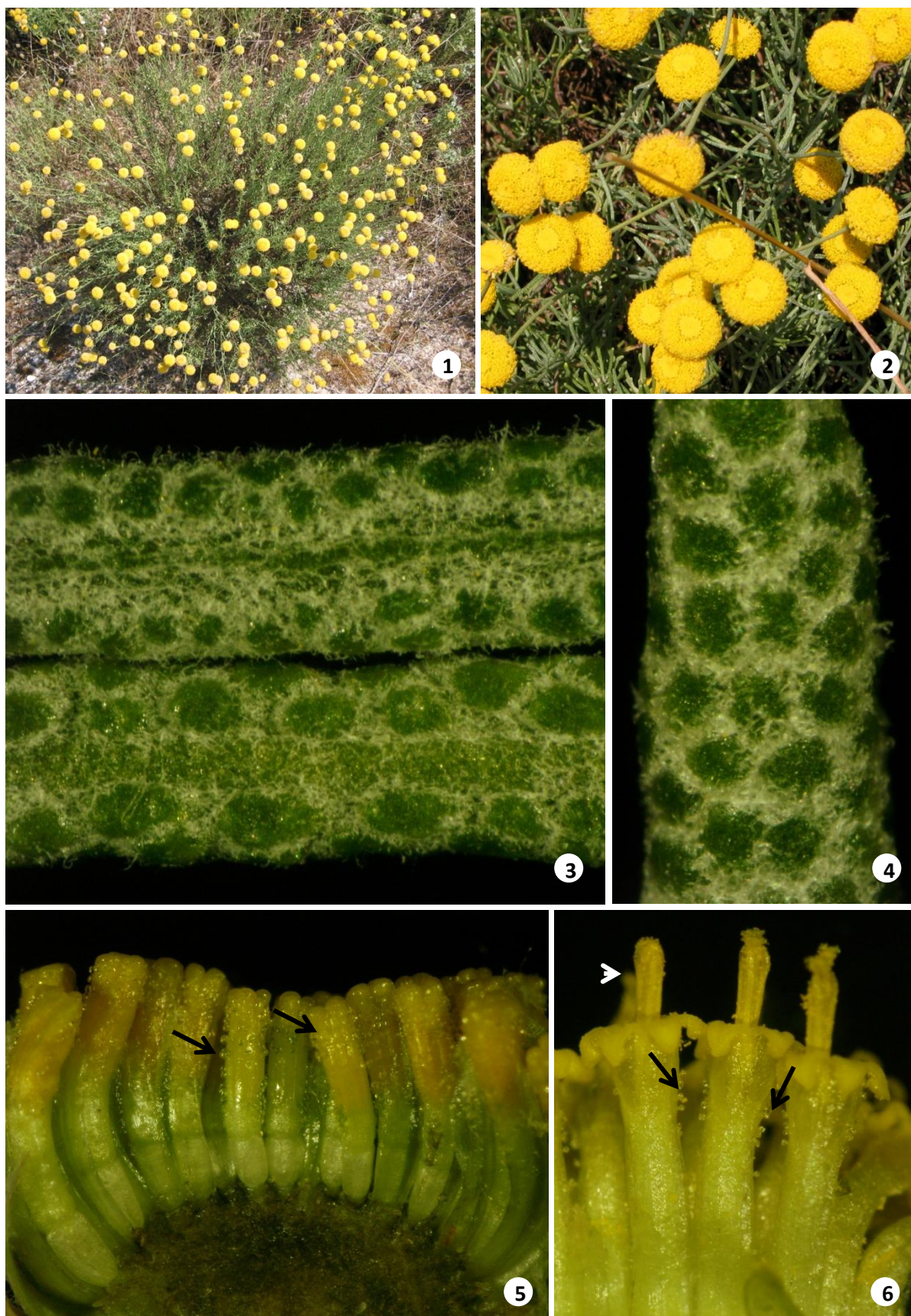
Figuras 3 e 4 – Superfície adaxial e abaxial de folhas adultas de *S. impressa* evidenciando a estrutura multilobada da folha e os tricomas de cobertura a nível das câmaras delimitados pelos lóbulos.

Figura 5 – Secção longitudinal de um capítulo jovem mostrando flores tubulosas antes da antese. Numerosos tricomas glandulares são bem visíveis na superfície externa do tubo da corola (seta). Note-se a ausência de papilho.

Figura 6 – Pormenor de flor tubulosa em antese. Observam-se bem os estames (ponta de seta) e os tricomas glandulares no tubo da corola (seta).



ESTAMPA VI



## ESTAMPA VII

### DISTRIBUIÇÃO E MORFOLOGIA DOS TRICOMAS E CANAIS DE *Santolina impressa*

Microfotografias de microscopia electrónica de varrimento de material fixado e seco pelo método do ponto crítico

Figura 1 – Superfície adaxial da folha coberta por tricomas não glandulares. Barra = 150  $\mu\text{m}$ .

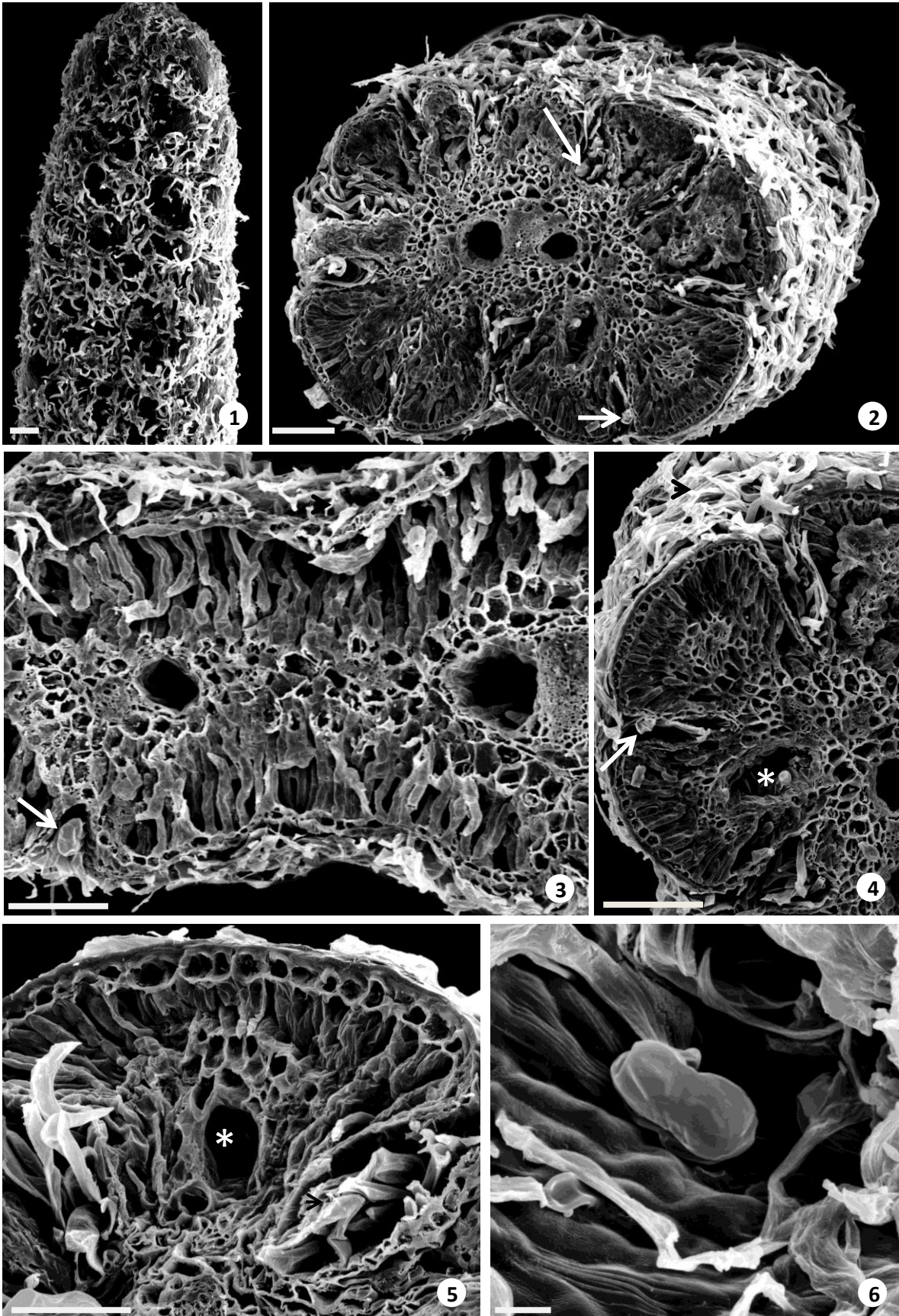
Figura 2 – Secção transversal de uma folha jovem evidenciando a sua estrutura multilobulada. A superfície adaxial encontra-se coberta por tricomas não glandulares e entre os lóbulos das folhas localizam-se os tricomas glandulares (seta). Observam-se associados ao feixe central dois canais secretores. Barra = 150  $\mu\text{m}$ .

Figura 3 – Secção transversal de folha adulta. Observam-se tricomas glandulares (seta) e não glandulares em sulcos da folha e dois canais secretores. Barras = 150  $\mu\text{m}$ .

Figuras 4 e 5 – Pormenor dos lóbulos da folha. São bem visíveis os sulcos da folha onde se localizam os tricomas glandulares (setas) e os não glandulares (pontas de seta). Observa-se ainda um canal secretor por lóbulo (asterisco). Barras = 150  $\mu\text{m}$ .

Figura 6 – Pormenor de um tricoma glandular bisseriado numa das câmaras delimitadas por dois lóbulos sucessivos. Barra = 25  $\mu\text{m}$ .





## ESTAMPA VIII

### DISTRIBUIÇÃO E MORFOLOGIA DOS TRICOMAS E CANAIS DE *Santolina impressa*

Microfotografias de microscopia electrónica de varrimento de material fixado e seco pelo método do ponto crítico

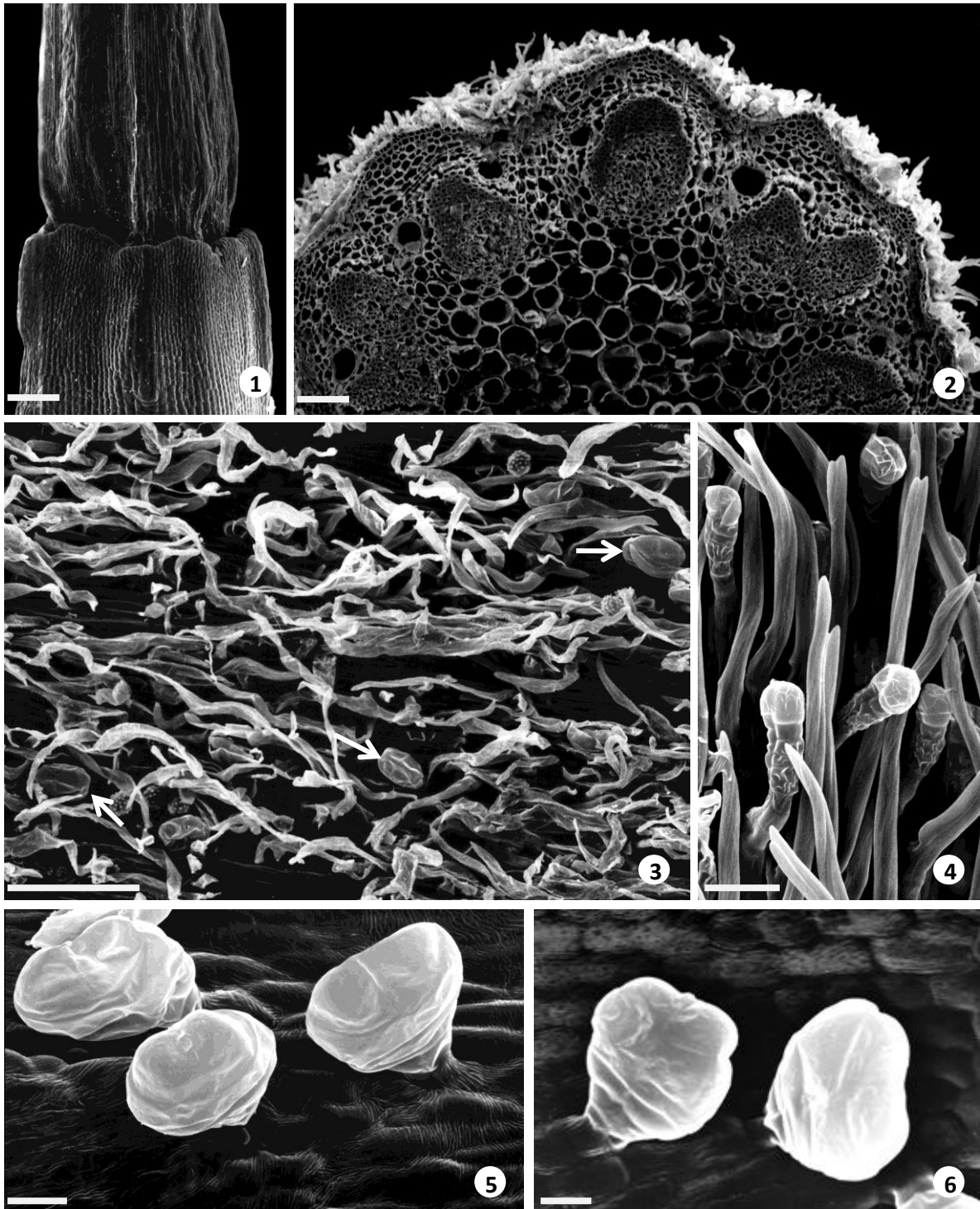
Figura 1 – Base da flor tubulosa. É de notar na base do tubo da corola a ausência de tricomas glandulares e não glandulares, assim como de papilho. Barra = 150  $\mu\text{m}$ .

Figura 2 – Secção transversal do pedúnculo da inflorescência. Observam-se canais secretores na proximidade dos feixes vasculares. Barra = 150  $\mu\text{m}$ .

Figura 3 – Superfície do pedúnculo da inflorescência. Observam-se por entre os tricomas não glandulares a cabeça dos tricomas glandulares (setas). Barra = 150  $\mu\text{m}$ .

Figura 4 – Tricomas glandulares bisseriados dispersos entre tricomas não glandulares no tubo da corola da flor tubulosa. Barra = 25  $\mu\text{m}$ .

Figuras 5 e 6 – Pormenor de tricomas glandulares bisseriados no ápice dos lóbulos das pétalas da flor tubulosa. Barras = 25  $\mu\text{m}$ .



## ESTAMPA IX

### ANATOMIA DOS TRICOMAS GLANDULARES E CANAIS SECRETORES DE *Santolina impressa*

Microfotografias de secções de material fixado e incluído em historesina. Coloração sequencial com Ácido Periódico/Reagente de Schiff (PAS) e Azul de Toluidina O

Figura 1 – Secção paradermal da folha. Note-se a estrutura multilobulada da folha, a presença de tricomas entre os diversos lóbulos (setas) e os canais secretores (asteriscos). Barra = 150 µm.

Figura 2 – Secção longitudinal da folha. Observa-se em cada lóbulo da folha um canal secretor e tricomas entre os lóbulos. Canais secretores são também visíveis associados aos feixes vasculares centrais. Barra = 150 µm.

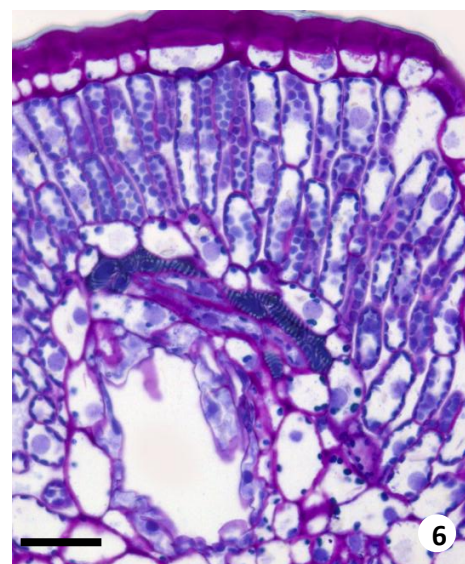
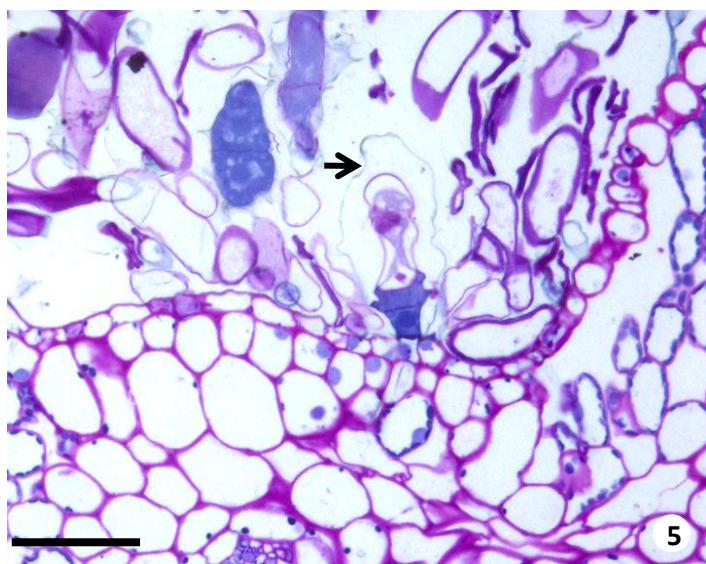
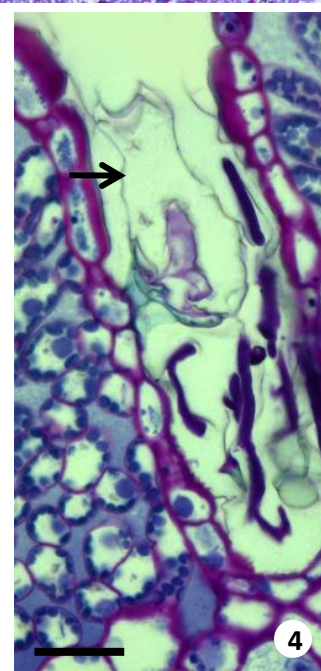
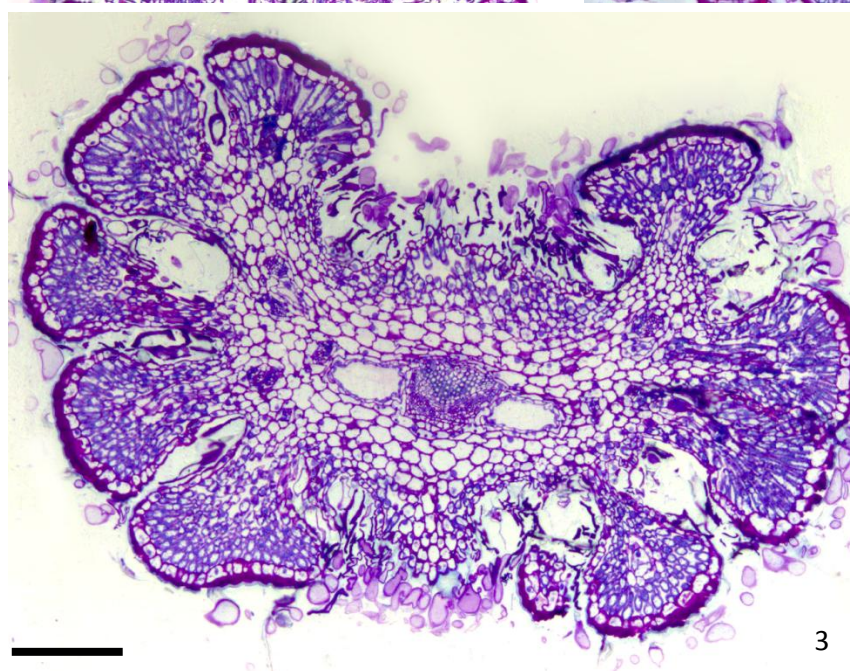
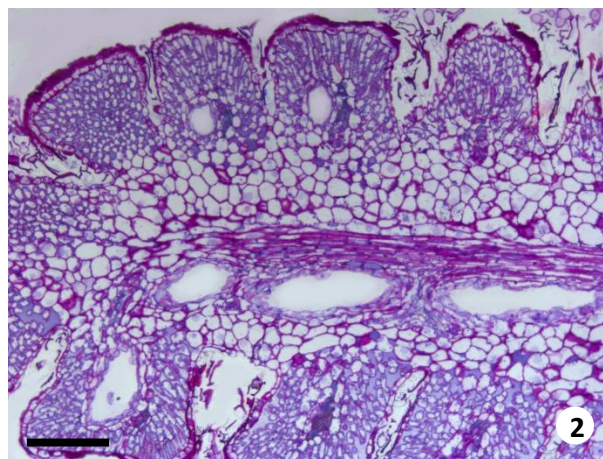
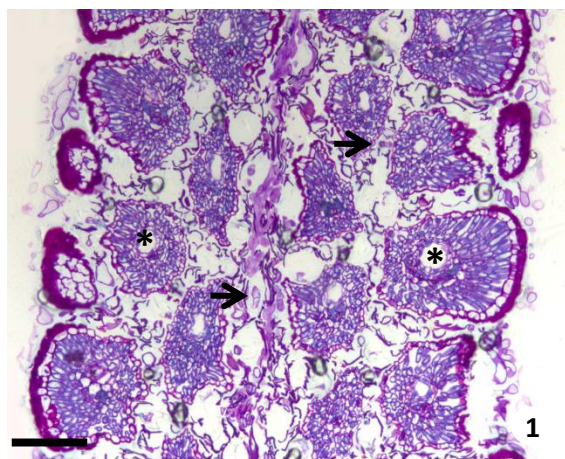
Figura 3 – Secção transversal de uma folha evidenciando a sua estrutura multilobada. Observam-se tricomas glandulares e não glandulares nas câmaras delimitadas pelos sulcos. São visíveis canais secretores por lóbulo e dois centrais associados ao feixe vascular. Barra = 150 µm.

Figuras 4 e 5 – Tricomas glandulares bisseriados. Observa-se o grande espaço subcuticular delimitado pela cutícula que se destacou da parede subadjacente (setas). Barras = 25 µm.

Figura 6 – Pormenor de canal secretor numa secção transversal da folha na proximidade de vasos xilémicos. O lúmen do canal está delimitado por uma camada de células epiteliais e envolvendo estas ocorre uma bainha formada por células hipertrofiadas. Barra = 25 µm.



# ESTAMPA IX



## ESTAMPA X

### CARACTERIZAÇÃO HISTOQUÍMICA DO SECRETADO DOS TRICOMAS GLANDULARES E CANAIS SECRETORES DE *Santolina impressa*

Aspectos microscópicos de secções transversais de tricomas e de canais secretores, em material fresco

Figura 1 – Canal secretor, sem qualquer coloração, no lóbulo de uma folha. Barra = 50 µm.

Figura 2 – Tricoma glandular bisseriados, sem qualquer coloração, evidenciando um volumoso espaço subcuticular onde o secretado se encontra acumulado. Barra = 50 µm.

Figuras 3 e 4 – Secções transversais de folhas. A cutícula da espessa parede externa das células epidérmicas coraram de vermelho assim como o secretado contido no lúmen dos canais do lóbulo da folha. [Coloração: Vermelho de Sudão IV]. Barras = 150 µm (3); 50 µm (4).

Figura 5 – Canal secretor associado ao feixe central com secretado no lúmen corado de vermelho. [Coloração: Azul do Nilo]. Barra = 50 µm.

Figura 6 – Tricoma glandular bisseriado mostrando o secretado corado de violeta. [Coloração: Azul do Nilo]. Barra = 50 µm.

Figura 7 – O secretado das células epiteliais do canal e o contido no lúmen coram de negro. [Coloração: Tetróxido de Ósmio]. Barra = 50 µm.

Figura 8 – Secção transversal de folha evidenciando a cutícula corada de azul. [Coloração: Reagente de Nadi]. Barra = 150 µm.

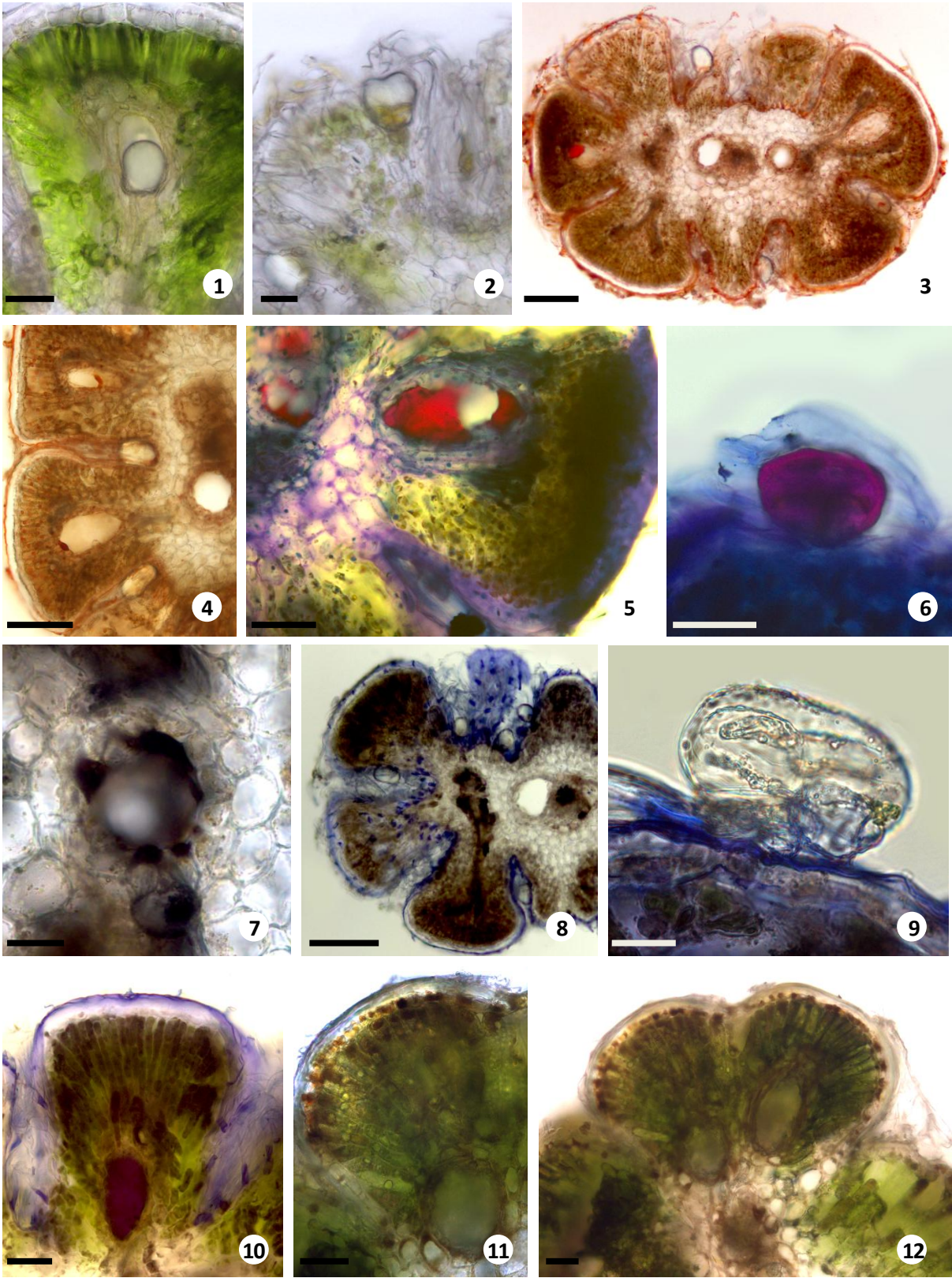
Figura 9 – Tricoma glandular maduro. [Coloração: Reagente de Nadi]. Barra = 20 µm.

Figura 10 – No lóbulo da folha observa-se um canal secretor com o conteúdo corado de púrpura e a cutícula corada de azul. [Coloração: Reagente de Nadi]. Barra = 50 µm.

Figura 11 – O conteúdo das células da epiderme e das células epiteliais dos canais coraram de coradas de castanho escuro. [Coloração: Cloreto de Ferro III]. Barra = 50 µm.

Figura 12 – O conteúdo das células da epiderme e das células epiteliais dos canais secretores coraram de castanho avermelhado. [Coloração: Dicromato de Potássio]. Barra = 50 µm.





## ESTAMPA XI

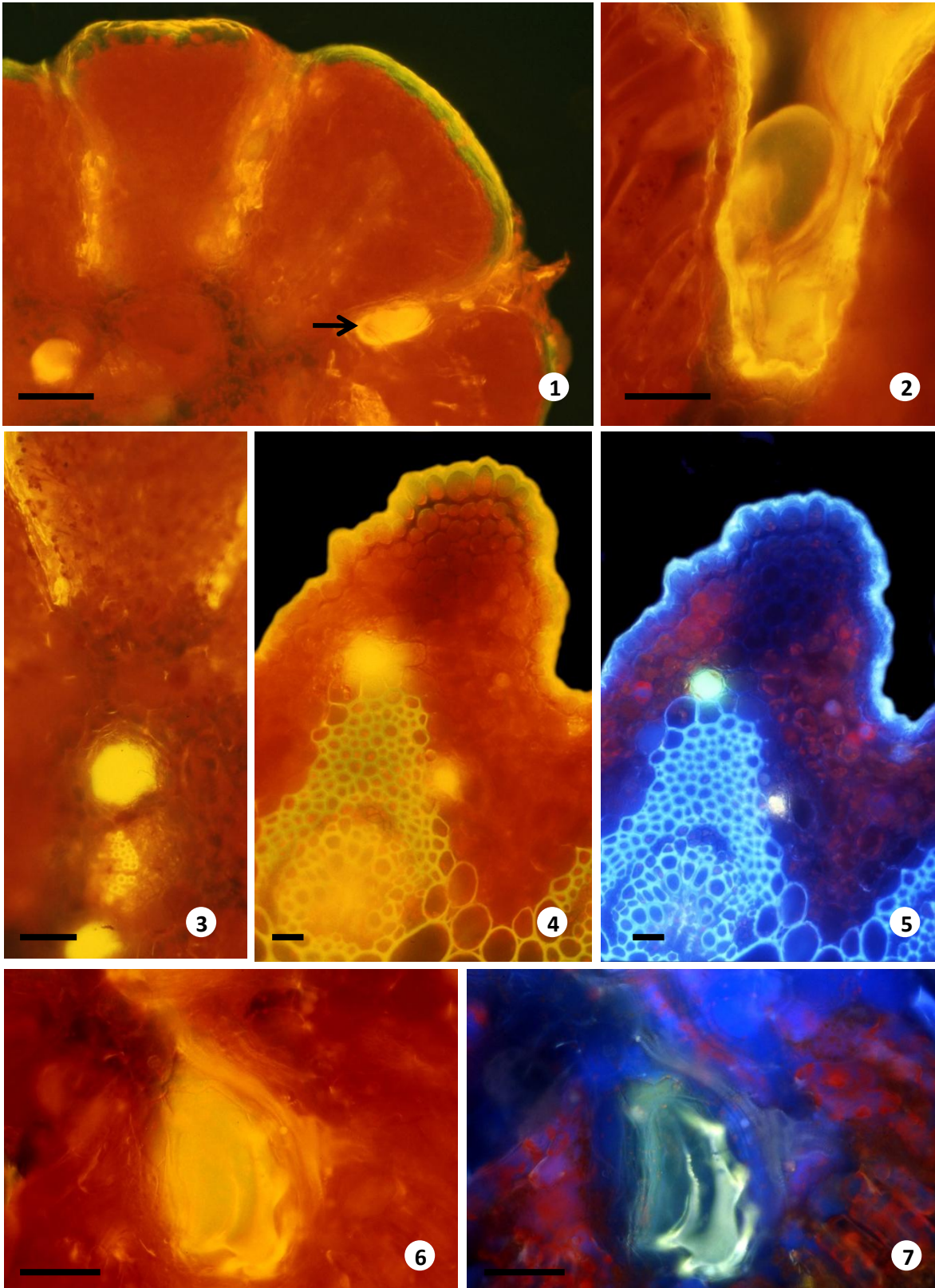
### CARACTERIZAÇÃO HISTOQUÍMICA DO SECRETADO DOS TRICOMAS GLANDULARES E DOS CANAIS SECRETORES DE *Santolina impressa*

Microfotografias de material fresco observado em luz ultravioleta e em luz azul

Figura 1-4 e 6 – Secções transversais da folha observados em luz azul. A cutícula e as paredes cutinizadas dos tricomas de cobertura autofluorescem intensamente de amarelo assim como o secretado contido nos tricomas (seta) e no lúmen dos canais. Barra = 150  $\mu\text{m}$  (1); 25  $\mu\text{m}$  (2); 50  $\mu\text{m}$  (4, 6).

Figura 5 e 7 – Secções transversais da folha observadas em luz ultravioleta. A cutícula e as paredes lenhificadas do esclerênquima autofluorescem azul assim como o secretado contido no lúmen dos canais. A intensidade da autofluorescência é tão elevada que o secretado fica esbranquiçado. Barra = 50  $\mu\text{m}$ .





## ESTAMPA XII

### FOTOGRAFIAS MACROSCÓPICAS DE EXEMPLARES DE *Solidago virgaurea*

Figura 1 – Aspecto geral de um exemplar de *S. virgaurea* em fase floral.

Figura 2 – Pormenor de um ramo floral mostrando os capítulos.

Figura 3 – Pormenor de um ramo foliar.

Figura 4 – Botão foliar evidenciando os tricomas glandulares (seta).

Figuras 5-7 – Pormenores de folhas mostrando a nervação e o recorte do limbo foliar. Na Figura 6 observa-se na superfície adaxial da folha, à periferia, tricomas de cobertura (seta). Na Figura 7 nota-se na superfície abaxial da folha, ao longo da nervura central, tricomas glandulares (seta).

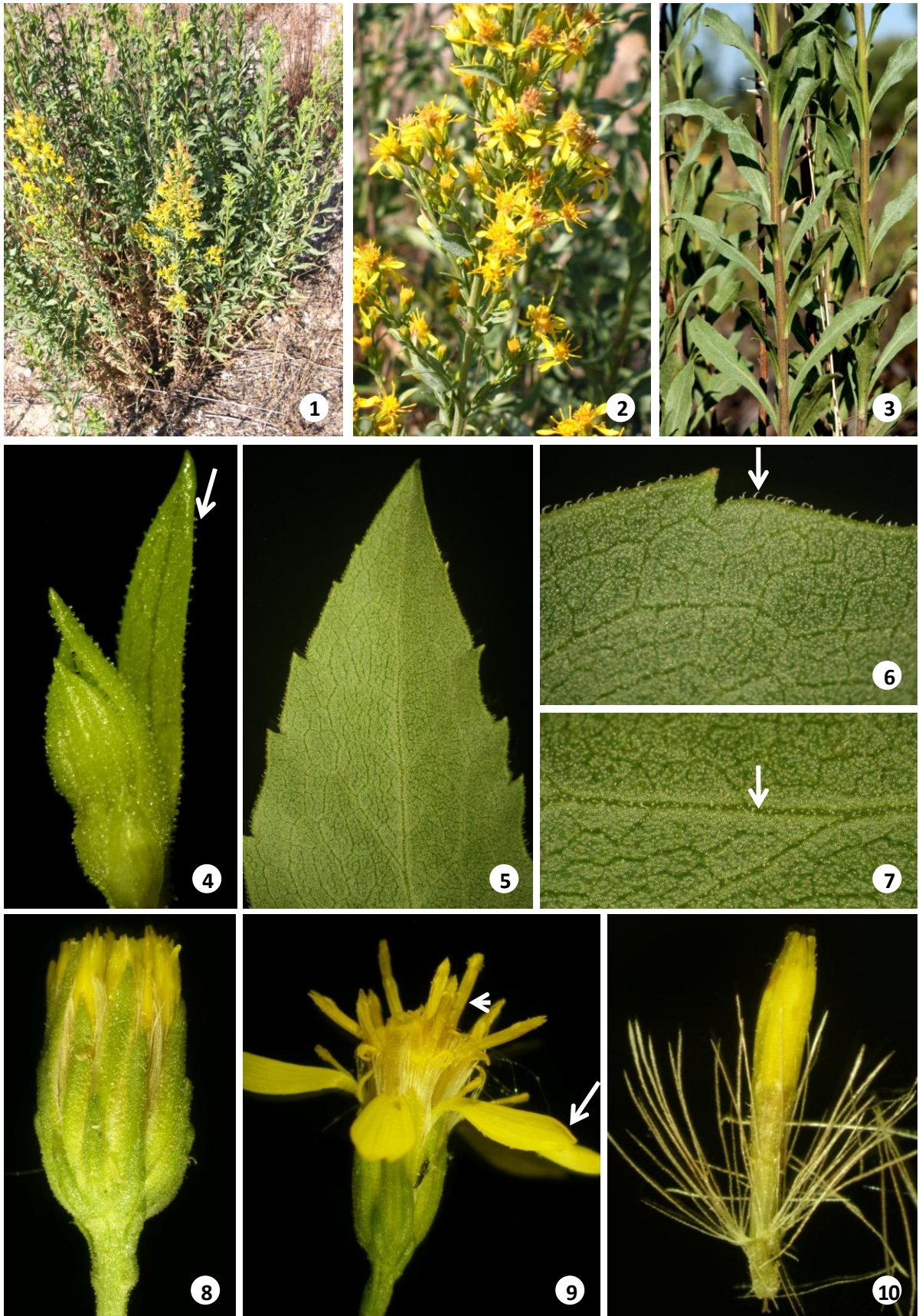
Figura 8 – Capítulo antes da antese. São bem visíveis as brácteas involucrias.

Figura 9 – Capítulo em antese. Observam-se na periferia algumas flores liguladas (setas) e no interior flores tubulosas (ponta de seta).

Figura 10 – Detalhe de uma flor tubulosa. Note-se a presença de papilho.



# ESTAMPA XII



### ESTAMPA XIII

#### DISTRIBUIÇÃO E MORFOLOGIA DOS TRICOMAS E CANAIS DE *Solidago virgaurea*

Microfotografias de microscopia electrónica de varrimento de material fixado e seco pelo método do ponto crítico

Figura 1 – Botão foliar. Observam-se nos primeiros pares de folhas uma grande densidade de tricomas glandulares.

Figura 2 – Superfície abaxial de uma folha adulta mostrando tricomas glandulares (setas) e não glandulares (ponta de setas). Barra = 150  $\mu\text{m}$ .

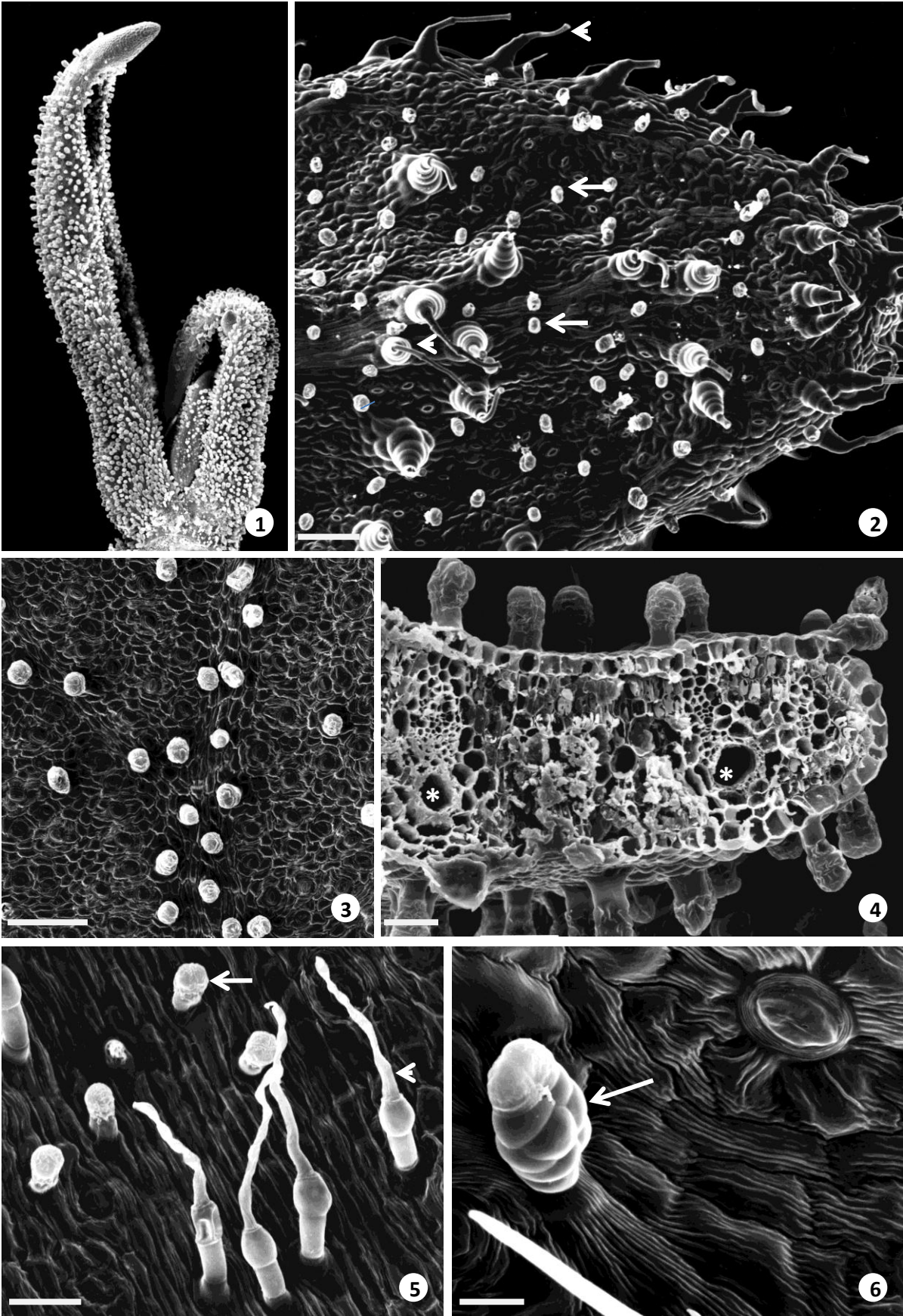
Figura 3 – Superfície abaxial da folha adulta. Observa-se uma distribuição preferencial dos tricomas glandulares ao longo da nervura da folha. Barra = 100  $\mu\text{m}$ .

Figura 4 – Secção transversal da folha adulta evidenciando tricomas glandulares em ambas as superfícies foliares. Observam-se também dois canais secretores (asteriscos). Barra = 50  $\mu\text{m}$ .

Figura 5 – Superfície adaxial da folha adulta. Observam-se tricomas glandulares (setas) e tricomas de cobertura em chicote (pontas de seta). Barras = 50  $\mu\text{m}$ .

Figura 6 – Tricoma glandular (seta) nas primeiras folhas. Note-se a estrutura pluricelular e bisseriada do tricoma. Barra = 20  $\mu\text{m}$ .





#### ESTAMPA XIV

##### DISTRIBUIÇÃO E MORFOLOGIA DOS TRICOMAS E CANAIS DE *Solidago virgaurea*

Microfotografias de microscopia electrónica de varrimento de material fixado e seco pelo método do ponto crítico.

Figura 1 – Tricomas glandulares no ápice de uma flor tubulosa fechada. Barra = 200  $\mu\text{m}$ .

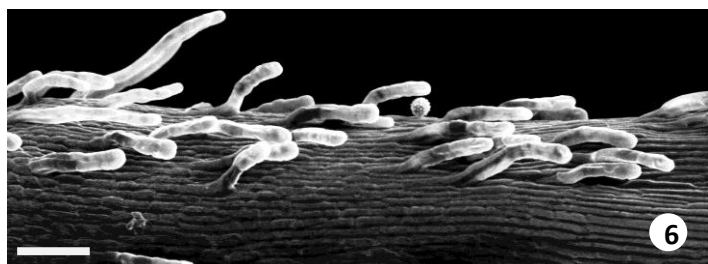
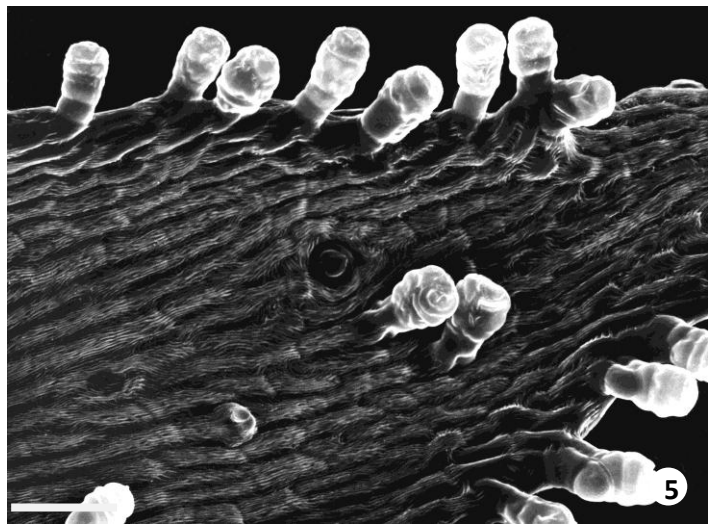
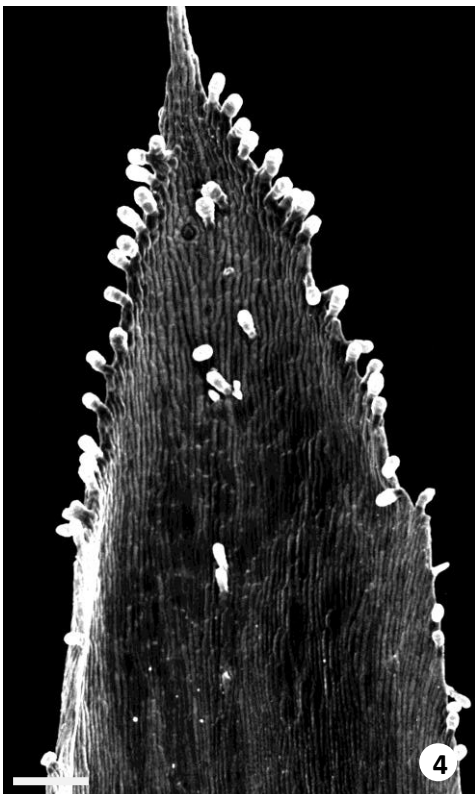
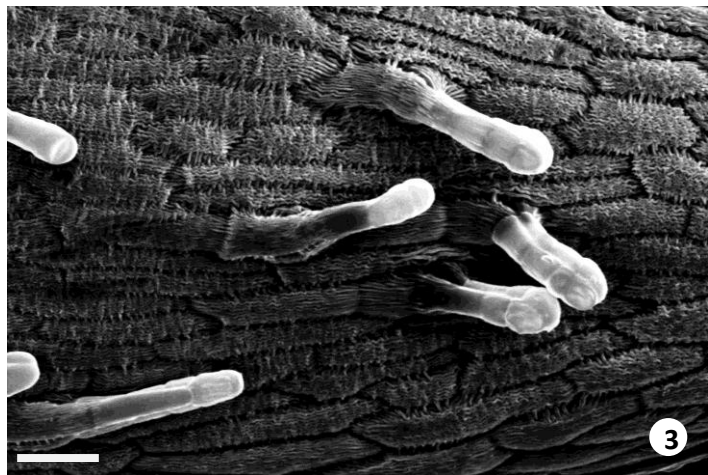
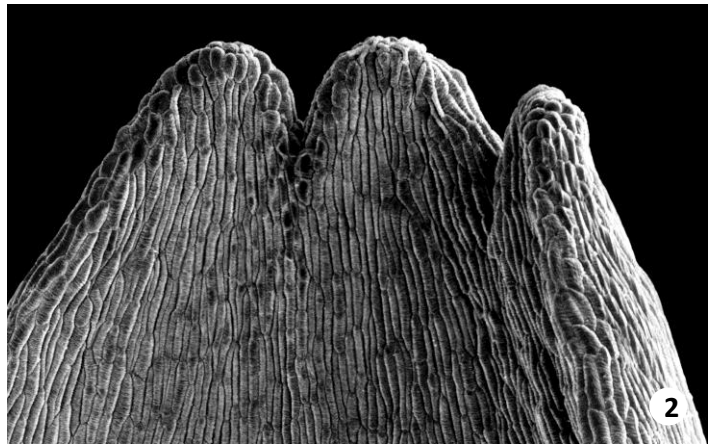
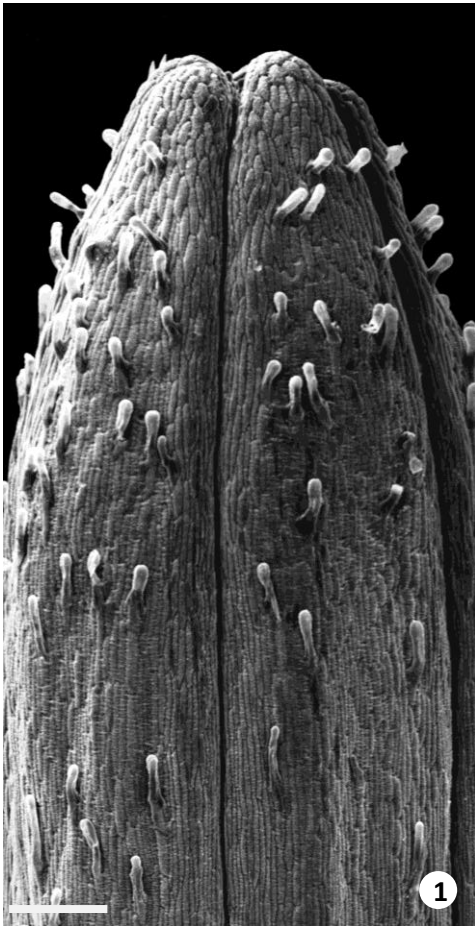
Figura 2 – Ápice da superfície adaxial da flor ligulada. É de notar a ausência de tricomas glandulares e não glandulares.

Figura 3 – Tricomas glandulares na superfície adaxial do ápice dos lóbulos livres das pétalas da flor tubulosa. Barra = 50  $\mu\text{m}$ .

Figura 4 e 5 – Tricomas glandulares na margem e na superfície adaxial de brácteas involucrais da inflorescência. Barra = 200  $\mu\text{m}$  (4); 50  $\mu\text{m}$  (5).

Figura 6 – Tricomas glandulares do terço médio basal da corola de uma flor tubular. Barra = 100  $\mu\text{m}$ .





## ESTAMPA XV

### ANATOMIA DOS TRICOMAS GLANDULARES E CANAIS SECRETORES DE *Solidago virgaurea*

Microfotografias de secções de material fixado e incluído em historesina. Coloração sequencial com Ácido Periódico/Reagente de Schiff (PAS) e Azul de Toluidina O.

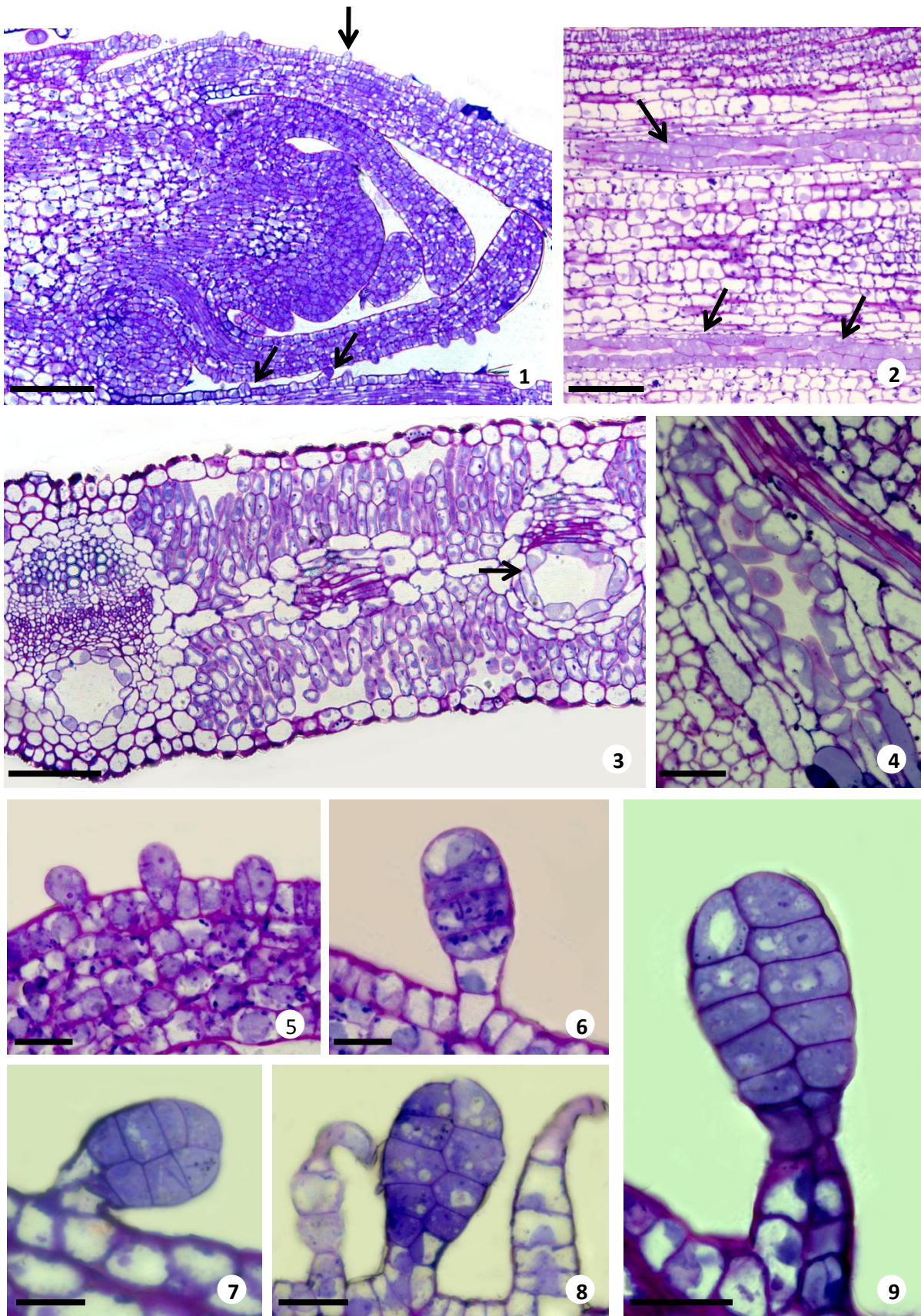
Figura 1 – Secção longitudinal de um botão foliar mostrando tricomas secretores em diferentes fases ontogénicas (setas). Barra = 100  $\mu\text{m}$ .

Figura 2 – Secção paradermal de uma folha jovem. Observam-se canais secretores em formação (setas). Barra = 100  $\mu\text{m}$ .

Figura 3 – Secção longitudinal de uma folha mostrando canais secretores associados a feixes vasculares, nomeadamente ao floema (seta). Barras = 50  $\mu\text{m}$

Figura 4 – Pormenor de um canal secretor mostrando as células glandulares do epitélio que delimitam o lúmen. Barra = 25  $\mu\text{m}$ .

Figura 5-9 – Pormenor de tricomas glandulares em várias fases da sua ontogenia. Barras = 20  $\mu\text{m}$  (5-8); 15  $\mu\text{m}$  (9). Iniciais de tricomas na protoderme de folhas jovens (Figura 5). Tricomas maduros evidenciando a sua estrutura bisseriada (Figuras 7-9). Na Figura 8 observam-se também tricomas não glandulares e na Figura 9 um tricoma não muito frequente nas folhas em que o pedículo tem um maior número de células.





## ESTAMPA XVII

### CARACTERIZAÇÃO HISTOQUÍMICA DO SECRETADO DOS TRICOMAS GLANDULARES E CANAIS SECRETORES DE *Solidago virgaurea*

Aspectos microscópicos de secções transversais de tricomas e de canais secretores, em material fresco. Observações em luz visível e em luz azul

Figura 1 – Tricomas glandulares bisseriados, sem qualquer coloração, mostrando o secretado acumulado no espaço subcuticular. Barra = 15 µm.

Figura 2 – Canal secretor em que o conteúdo das células da bainha coraram de vermelho. [Coloração: Vermelho de Sudão IV]. Barras = 15 µm.

Figura 3 – Tricoma bisseriado com secretado nas células glandulares corado de vermelho. [Coloração: Vermelho de Sudão IV]. Barras = 15 µm.

Figura 4 – Tricoma glandular bisseriado com material vacuolar corado de azul. O secretado que por escorrência se acumulou junto do pedículo corou de violeta. [Coloração: Azul do Nilo]. Barra = 15 µm.

Figura 5 – Canal secretor com o conteúdo das células epiteliais coradas de castanho. [Coloração: Tetróxido de Ósmio]. Barras = 25 µm.

Figura 6 – Tricoma glandular bisseriado jovem com secretado num pequena câmara subcuticular corado de castanho. [Coloração: Tetróxido de Ósmio]. Barra = 15 µm.

Figura 7 – Canal secretor em que o lúmen está completamente obliterado por secretado corado de violeta. [Coloração: Reagente de Nadi]. Barras = 25 µm.

Figura 8 – Tricoma bisseriado jovem com secretado corado de violeta, provavelmente no vacúolo. [Coloração: Reagente de Nadi]. Barra = 15 µm.

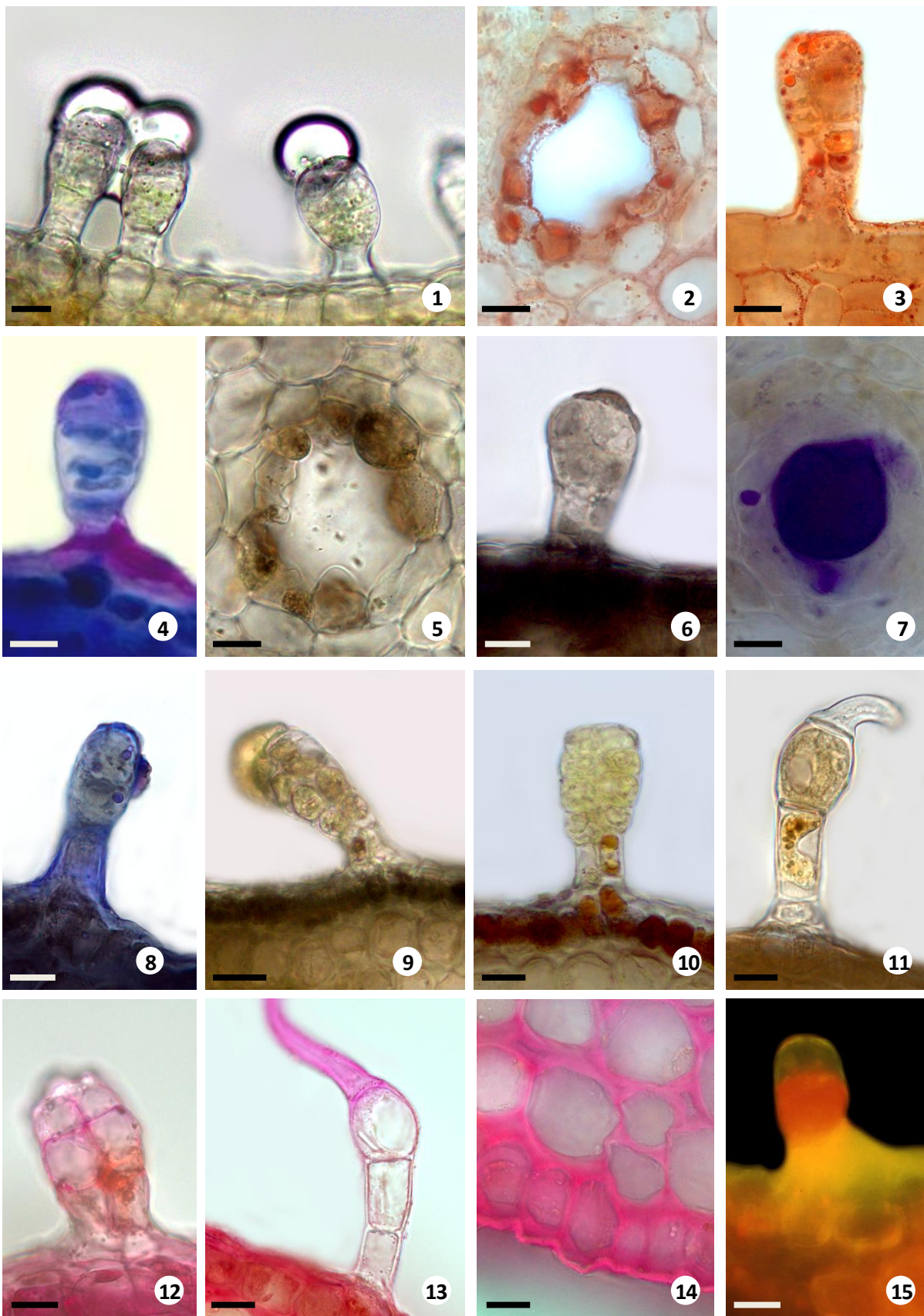
Figuras 9 e 10 – O conteúdo das células da epiderme e das células do ápice dos tricomas glandulares coraram de castanho escuro. Ausência de coloração no espaço subcuticular. [Coloração: Cloreto de Ferro III]. Barra = 15 µm

Figura 11 – Tricoma não glandular em chicote com material vacuolar das células proximais do pedúnculo corado de castanho avermelhado. [Coloração: Dicromato de Potássio]. Barra = 15 µm

Figuras 12-14 – Apenas a parede dos tricomas glandulares (Figura 12) e a parede da última célula distal dos tricomas em chicote (Figura 13) bem como a das células da epiderme e do colênquima (Figura 14) coraram de rosa. A cutícula da parede externa da epiderme não corou (Figura 14). [Coloração: Vermelho de de Ruténio]. Barra = 15 µm (12,13); 10 µm (14).

Figura 15 – Tricoma glandular bisseriado observado em luz azul, exibindo uma intensa autofluorescência amarela nas células apicais e laranja nas células glandulares. Barra = 25 µm.

# ESTAMPA XVI





## VI. Conclusões e Perspectivas Futuras

---





## 1. Conclusões

Os extractos aquosos de *Helichrysum italicum*, *Santolina impressa* e *Solidago virgaurea* apresentam uma elevada actividade biológica. Foi estudada a capacidade inibitória do crescimento das estirpes bacterianas *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*, sendo a melhor actividade antibacteriana apresentada pelo extracto aquoso de caules/folhas de *H. italicum*. O extracto aquoso de flores de *H. italicum* apresentou os melhores valores para as actividades antioxidante e inibitória do enzima acetilcolinesterase. Os extractos aquosos das flores das três espécies de Asteraceae em estudo apresentam valores mais elevados para a actividade inibitória deste enzima, comparativamente aos extractos de caules/folhas. A actividade antioxidante dos extractos aquosos em estudo é superior à do padrão BHT utilizado na indústria alimentar.

Os componentes maioritários dos três extractos aquosos possuem estrutura química semelhante à do ácido cafeico. Como componentes maioritários do extracto aquoso das folhas de *H. italicum* foram identificados, por espectrometria de massa, quercetina-4-O-glucósido e taxifolina-3-O-xilósido.

O estudo do metabolismo *in vitro* dos extractos através do tracto digestivo, estudado por acção dos sucos gástrico e pancreático artificiais como simulação da digestão dos extractos, sugere que estes não sofreram degradação, não tendo sido registadas alterações significativas nem na sua composição química nem na sua actividade biológica.

Com o ensaio da digestão por  $\beta$ -glucuronidase de *Escherichia coli*, concluiu-se que nos extractos aquosos em estudo não existem moléculas glucuronadas.

À excepção do extracto aquoso de caules/folhas de *H. italicum*, todos os restantes foram considerados como pouco citotóxicos para células HeLa e Caco-2. O extracto de *S. virgaurea*, a segunda espécie com melhores resultados para as actividades biológicas testadas, é o menos citotóxico para estas duas linhas celulares.

O estudo da biodisponibilidade de compostos dos extractos aquosos, permitiu verificar que os compostos com maior tempo de retenção foram encontrados em maior percentagem no pólo basal da câmara e no interior das células. Assim, quanto menor a polaridade de um composto (maior o tempo de retenção), maior a permeabilidade desse composto através da membrana, sugerindo que não necessita de transportadores específicos

As três espécies de Asteraceae em estudo apresentam nos órgãos vegetativos e florais um indumento misto, constituído por tricomas glandulares bisseriados e tricomas não glandulares. Os

tricomas glandulares diferenciam-se muito precocemente durante a diferenciação dos órgãos, deste modo a densidade de tricomas (número por unidade de área) diminui dos órgãos jovens para os maduros. Nos tricomas glandulares o secretado acumula-se num espaço subcuticular, formado por distensão e destacamento da cutícula das camadas subadjacentes da parede celular das células apicais da cabeça glandular, sendo libertado por ruptura da cutícula. Em *S. impressa* e *S. virgaurea* foram ainda observados canais secretores junto dos feixes vasculares.

O estudo histoquímico permitiu concluir o secretado dos tricomas de *H. italicum* é um óleo essencial rico em compostos fenólicos e os secretados de *S. impressa* e de *S. virgaurea* são oleorresinas igualmente ricas em compostos fenólicos. Quer num caso quer noutro os flavonóides estão presentes sob a forma agliconas.

## 2. Perspectivas Futuras

Os resultados apresentados nesta dissertação permitem propor a continuação deste estudo. Deste modo considera-se importante:

- Optimizar o processo de identificação por espectroscopia de massa de todos os constituintes dos extractos aquosos de *H. italicum*, *S. impressa* e *S. virgaurea*. Esta identificação permitirá inferir sobre a relação entre a estrutura dos compostos e as actividades biológicas estudadas, citotoxicidade e a biodisponibilidade dos compostos.
- Realizar os estudos de actividade antibacteriana com extractos aquosos de flores das três espécies de forma a comparar com os resultados obtidos com as folhas.
- Verificar se os extractos têm actividade fungicida e virucida relevante.
- Estudar o metabolismo *in vitro* dos três extractos através do tracto digestivo, incluindo o passo inicial da digestão por saliva artificial, de forma contínua, ou seja, utilizando sempre a mesma amostra.
- Identificar qual/quais dos compostos presentes no extracto de *H. italicum* são responsáveis pela sua citotoxicidade.
- Estudar que transportadores celulares são responsáveis pela biodisponibilidade dos compostos presentes nos três extractos.
- Prosseguir os estudos morfo-anatómicos nas três espécies, optimizando processos de fixação, de forma a preservar as estruturas secretoras e secretados. Realizar estudos em microscopia electrónica de transmissão de modo a correlacionar a ultraestrutura das células glandulares com as vias biossintéticas dos compostos maioritários presentes nos extractos.

## VII. Referências Bibliográficas

---



- Adedeji, O. & Jewoola, O. A. (2008). Importance of leaf epidermal characters in the Asteraceae family. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 36, 7-16.
- Afolayan, A. J. & Meyer, J. J. M. (1995). Morphology and ultrastructure of secreting and nonsecreting foliar trichomes of *Helichrysum aureonitens* (Asteraceae). *International Journal of Plant Sciences*, 156, 481-487.
- Agrawal, A. A. & Konno, K. (2009). Latex: a model for understanding mechanisms, ecology, and evolution of plant defense against herbivory. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 40, 311-331.
- Agullo, G., Gamet, L., Besson, C., Demigné, C. & Rémésy, C. (1994). Quercetin exerts a preferential cytotoxic effect on active dividing colon carcinoma HT29 and Caco-2 cells. *Cancer Letters*, 87, 55-63.
- Aiyegoro, O. A. & Okoh, A. I. (2009). Phytochemical screening and polyphenolic antioxidant activity of aqueous crude leaf extract of *Helichrysum pedunculatum*. *International Journal of Molecular Sciences*, 10, 4990-5001.
- Albayrak, S., Aksoy, A., Sagdic, O. & Hamzaoglu, E. (2010). Compositions, antioxidant and antimicrobial activities of *Helichrysum* (Asteraceae) species collected from Turkey. *Food Chemistry*, 119, 114-122.
- Ames, B. M. (1983). Dietary carcinogens and anticarcinogens: oxygen radical and degenerative diseases. *Science*, 221, 1256-1263.
- Anderson, L. C. & Creech, J. B. (1975). Comparative leaf anatomy of *Solidago* and related Asteraceae. *American Journal of Botany*, 62, 486-493.
- Andreucci, A. C., Ciccarelli, D., Desideri, I. & Pagni, A. M. (2008). Glandular hairs and secretory ducts of *Matricaria chamomilla* (Asteraceae): morphology and histochemistry. *Annales Botanici Fennici*, 45, 11-18.
- Angioni, A., Barra, A., Arlorio, M., Coisson, J. D., Russo, M. T., Pirisi, F. M., Satta, M. & Cabras, P. (2003). Chemical composition, plant genetic differences, and antifungal activity of the essential oil of *Helichrysum italicum* G. Don spp. *microphyllum* (Willd) Nym. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 1030-1034.
- Apáti, P., Szentmihályi, K., Kristó, Sz. T., Papp, I., Vinkler, P., Szoke, É. & Kéry, Á. (2003). Herbal remedies of *Solidago* – correlation of phytochemical characteristics and antioxidative properties. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 32, 1045-1053.
- Appendino, G., Ottino, M., Marquez, N., Bianchi, F., Giana, A., Ballero, M., Sterner, O., Fiebich, B. L. & Munoz, E. (2007). Arzanol, an anti-inflammatory and anti-HIV-1 phloroglucinol  $\alpha$ -pyrone from *Helichrysum italicum* spp. *microphyllum*. *Journal of Natural Products*, 70, 608-612.
- Aruoma, O. I. (1998). Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 75, 199-212.

- Ascensão, L., Silva, J. A. T., Barroso, J. G., Figueiredo, A. C. & Pedro, L. (2001). Glandular trichome and essential oils of *Helichrysum stoechas*. *Israel Journal of Plant Sciences*, 49, 115- 122.
- Ascensão, L. & Pais, M. S. (1987). Ultrastructure and histochemistry of secretory ducts in *Artemisia campestris* spp. *Maritime* (Compositae). *Nordic Journal of Botany*, 8, 283-292.
- Aslan, M., Orhan, D. D., Orhan, N., Sezik, E. & Yesilada, E. (2007). *In vivo* antidiabetic and antioxidant potential of *Helichrysum plicatum* ssp. *plicatum capitulum* in streptozotocin-induced-diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 109, 54-59.
- Bachurin, S. O. (2003). Medicinal chemistry approaches for the treatment and prevention of Alzheimer's disease. *Medicinal Research Reviews*, 23, 48-88.
- Beaud, D., Tailliez, P. & Anba-Mondoloni (2005). Genetic characterization of the  $\beta$ -glucuronidase enzyme from a human intestinal bacterium, *Ruminococcus gnavus*. *Microbiology*, 151, 2323-2330.
- Bilušić, T. K., Katalinić, V., Uzelac, V. D., Ljubenković, I., Kriško, A., Dejanović, B., Jukić, M., Politeo, O., Pifat, G. & Milos, M. (2008). Antioxidant and acetylcholinesterase inhibiting activity of several aqueous tea infusions *in vitro*. *Food Technology and Biotechnology*, 46, 368-375.
- Bongartz, D. & Hesse, A. (1995). Selective extraction of quercetrin in vegetable drugs and urine by off-line coupling of boronic acid affinity chromatography and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, 673, 223-230.
- Borneo, R., León, A. E., Aguirre, A., Ribotta, P., Cantero, J. J. (2009). Antioxidant capacity of medicinal plants from the Province of Córdoba (Argentina) and their *in vitro* testing in a model food system. *Food Chemistry*, 112, 664-670.
- Bylka, W., Matlawska, I & Pilewski, N. A. (2004). Natural flavonoids as antimicrobial agents. *Jana*, 7, 24-31.
- Calabrese, V., Scapagnini, G., Colombrita, C., Ravagna, A., Pennisi, G., Stella, A. M. G., Galli, F. & Butterfield, D. A. (2003). Redox regulation of heat shock proteins expression in aging and neurodegenerative disorders associated with oxidative stress: A nutritional approach. *Amino Acids*, 25, 437-444.
- Camejo-Rodrigues, J. S. (2007). Estudo etnobotânico das plantas aromáticas e medicinais. In: Figueiredo, A. C., Barroso, J. G., Pedro, L. G. *Potencialidades e aplicações das plantas aromáticas e medicinais. Curso Teórico-Prático* (3<sup>rd</sup> ed) pp. 168-174. Lisboa: Edição da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa – Centro de Biotecnologia Vegetal.
- Camejo-Rodrigues, J., Ascensão, L., Bonet, M. A. & Valles, J. (2003). An ethnobotanical study of medicinal and aromatic plants in Natural Park of "Serra de São Mamede" (Portugal). *Journal of Ethnopharmacology*, 89, 199-209.
- Cárdenas, M., Marder, M., Blank, V. C. & Roguin, L. P. (2006). Antitumor activity of some natural flavonoids and synthetic derivatives on various human and murine cancer cell lines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14, 2966-2971.
- Carini, M., Aldini, G., Furlanetto, S., Stefani, R. & Facino, R. M. (2001). LC coupled to ion-trap MS for the rapid screening and detection of polyphenol antioxidants from *Helichrysum stoechas*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 24, 517-526.

- Carpinela, M. C., Androne, D. G., Ruiz, G., Palacios, S. M. (2010). Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plant extracts from Argentina. *Phytotherapy Research*, 24, 259-263.
- Carrilho, R. B. D. (2009). Estudos de metabolismo, *in vitro*, de extractos aquosos de funcho, *Foeniculum vulgare*. Aplicações terapêuticas na Doença de Alzheimer (Dissertação de Mestrado). Acedido de: <http://hdl.handle.net/10451/3709>.
- Castro, M. M., Leitão-Filho, H. F. & Monteiro, W. R. (1997). Utilização de estruturas secretoras na identificação dos gêneros de Asteraceae de uma vegetação de cerrado. *Revista Brasileira de Botânica*, 20, 163-174.
- Cavero, R. Y., Akerreta, S. & Calvo, M. I. (2011). Pharmaceutical ethnobotany in Northern Navarra (Iberian Peninsula). *Journal of Ethnopharmacology*, 133, 138-146.
- Charriere-Ladreix, Y. (1973). Étude de la secretion flavonoidique des bourgeons de *Populus nigra* L. var. *italica*: Cinétique du phénomène secretore; ultrastructure et evolution des tissu glandulaire. *Journal Microscopie*, 17, 299-316.
- Chauchan, V. & Chauchan, A. (2006). Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Pathophysiology*, 13, 195-208.
- Costerton, J. W., Stewart, P. S. & Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284, 1318-1322.
- Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12, 564-582.
- Crespy, V., Morand, C., Besson, C., Manach, C., Demigne, C. & Remesy, C. (2002). Quercetin, but not its glycosides, is absorbed from the rat stomach. *Journal of Agricultural Chemistry*, 50, 618-621.
- Davis, K. A. M., Masella, J. & Blennerhassett (1998). Acetylcholine metabolism in the inflamated rat intestine. *Experimental Neurology*, 152, 251-258.
- Demir H., Açık, L., Bali, E. B., Koç, L. Y. & Kaynak, G. (2009). Antioxidant and antimicrobial activities of *Solidago virgaurea* extracts. *African Journal of Biotechnology*, 8, 274-279.
- Duarte, M. R., Wolf, S. & Paula, B. G. (2008). *Smallanthus sonchifolius* (Poepp.) H. Rob. (yacón): identificação microscópica de folha e caule para o controle de qualidade farmacognóstico. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 44, 157-164.
- Duke, S. O. & Paul, R. N. (1993). Development and fine structure of glandular trichomes of *Artemisia annua* L. *International Journal of Plant Sciences*, 154, 107-118.
- Evert, R. F. & Eichhorn, S. E. (2006). *Esau's Plant Anatomy: meristems, cells and tissues of the plant body – Their structure, function and development* (3<sup>rd</sup> ed). New Jersey: Wiley-Blackwell.
- Eroğlu, H. E., Aksoy, A., Hamzaoglu, E., Budak, Ü. & Albayrak, S. (2009). Cytogenetic effects of nine *Helichrysum* taxa in human lymphocytes culture. *Cytotechnology*, 59, 65-72.
- Facino, R. M., Carini, M., Franzoi, L., Pirola, O. & Bosisio, E. (1990). Phytochemical characterization and radical scavenger activity of flavonoids from *Helichrysum italicum* G. Don (compositae). *Pharmacological Research*, 22, 709-721.
- Ferreira, J. F. S. & Janick, J. (1995). Floral morphology of *Artemisia annua* with special reference to trichomes. *International Journal of Plant Science*, 156, 807-815.

- Ferreira, A., Proença, C., Serralheiro, M. L. M. & Araújo, M. E. M. (2006). The *in vitro* screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. *Journal of Ethnopharmacology*, 108, 31-37.
- Figueiredo, A. C. & Pais, M. S. (1994). Ultrastructural aspects of the glandular cells from the secretory trichomes and from the cell suspension cultures of *Achillea millefolium* L. ssp. *Millefolium*. *Annals of Botany*, 74, 179-190.
- Figueiredo, N. L., Aguiar, S. R., Falé, P. L., Ascensão, L., Serralheiro, M. L. & Lino, A. R. (2010). The inhibitory effect of *Plectranthus barbatus* and *Plectranthus ecklonii* leaves on the viability, glucosyltransferase activity and biofilm formation of *Streptococcus sobrinus* and *Streptococcus mutans*. *Food Chemistry*, 119, 664-668.
- Filho, V. C. & Yunes, R. A. (1998). Estrategies for obtaining pharmacologically active compounds from medicinal plants. Concepts about structural modification for improve the activity. *Quimica Nova*, 21, 99-105.
- Francis, P. T., Palmer, A. M., Snape, M. & Wilcock, G. (1999). The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 66, 137-147.
- Frasco M. F., Fournier D., Carvalho F. & Guilhermino L. (2005). Do metals inhibit acetylcholinesterase (AChE)? Implementation of assay conditions for the use of AChE activity as a biomarker of metal toxicity. *Biomarkers*, 10, 360-375.
- Freires, I. A., Alves, L. A., Jovito, V. C., Almeida, L. F. D., de Castro, R. D. & Padilha, W. W. N. (2010). *In vitro* antibacterial and antiadherent activities of tinctures from *Schinus terebinthifolius* (Aroeira) and *Solidago microglossa* (Arnica) on dental biofilm forming bacteria. *Odontologia Clínica-Científica*, 9, 139-143.
- Funk, V. A., Bayer, R. J., Keeley, S., Chan, R., Watson, L., Gemeinholzer, B., Schilling, E., Panero, J. L., Baldwin, B. G., Garcia-Jacas, N., Susanna, A. & Jansen, R. K. (2005). Everywhere but Antarctica: Using a supertree to understand the diversity and distribution of the Compositae. *Biol. Skr*, 55, 343-374.
- Garcia, M. N., Flowers, C. & Cook, J. D. (1995). The Caco-2 cell culture system can be used as a model to study food iron availability. *The Journal of Nutrition*, 251-258
- Geisser, T., Brandt, W., Porzel, A., Schlenzig, D., Kehlen, A., Wessjohann, L. & Arnold, N. (2010). Acetylcholinesterase inhibitors from the toadstool *Cortinarius infractus*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18, 2173-2177.
- Giner, R. M., Ríos, J. L. & Villar, A. (1989) Inhibitory effects of *Santolina chamaecyparissus* extracts against spasmogen agonists. *Journal of Ethnopharmacology*, 27, 1-6.
- Gnahuoé, G., N'guessan, J. D., Koffi, E., Treoré, F. & Guédé-Guina, F. (2009). *In vitro* anticholinesterase and cholinergic effect of the aqueous extract of *Trema guineensis* on rabbit duodenum. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 8, 11-17.
- Gott, R. M., Tavares, W. S., Pereira, A. I. A., Teodoro, R. B., Petacci, F. & Freitas, S. S. (2010). Potencial químico de plantas daninhas Asteraceae de campos rupestres de Diamantina, Minas Gerais. *XXVII Congresso Brasileiro da Ciência das Plantas Daninhas*, 3129-3133.



- Gross, S. C., Goodarzi, G., Watabe, M., Bandyopadhyay, S., Pai, S. K. & Watabe, K. (2002). Antineoplastic activity of *Solidago virgaurea* on prostatic tumor cells in a SCID mouse model. *Nutrition and Cancer*, 43, 76-81.
- Guinoiseau, E., Luciani, A., Rossi, P. G., Quilichini, Y., Ternengo, S., Bradesi, P. & Berti, L. (2010). Cellular effects induced by *Inula graveolens* and *Santolina corsica* essential oils on *Staphylococcus aureus*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 29, 873-879.
- Gulcin, I., Oktay, M., Kirec,ci, E., & Kufrevioglu, O. I. (2003). Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts. *Food Chemistry*, 83, 371–382.
- Gurib-Falkim, A. (2006). Medicinal Plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, 27, 1-93.
- Heinrich, G. (2002). Glandular hairs of *Siegebeckia jorullensis* Kunth (Asteraceae): morphology, histochemistry and composition of essential oil. *Annals of Botany*, 89, 459-469.
- Heinrich, M. & Teoh, H. L. (2004). Galanthamine from snow-drop – The development of a modern drug against Alzheimer’s Disease from local Caucasian knowledge. *Journal of Ethnopharmacology*, 92, 147-162.
- Hernandez, M. F., Falé, P. L. V., Araújo, M. E. M. & Serralheiro, M. L. M. (2010). Acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of the water extracts of several *Hypericum* species. *Food Chemistry*, 120, 1076-1082.
- Hidalgo, I. J., Raub, T. J. & Borchardt, R. T. (1989). Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology*, 96(3), 736-749.
- Hirota, C. L. & McKay, D. M. (2006). Cholinergic regulation of epithelial ion transport in the mammalian intestine. *British Journal of Pharmacology*, 149, 463-479.
- Holzer, P. & Maggi, C. A. (1994). Synergistic role of muscarinic acetylcholine and tachykinin NK-2 receptors in intestinal peristalsis. *Naunyn-Schmiedeberg’s Archives of Pharmacology*, 349, 194-201.
- Horai, H., Arita, M., Kanaya, S., Nihei, Y., Ikeda, T., Suwa, K.,... Nishioka, T. (2010). MassBank: A public repository for sharing mass spectral data for life sciences. *Journal of Mass Spectrometry*, 45, 703-714.
- Howes, M. R., Perry, N. S. L. & Houghton, P. J. (2003). Plants with traditional uses and activities relevant to the management of Alzheimer’s disease and other cognitive disorders. *Phytotherapy Research*, 17, 1-18.
- Ingkaninan, K., Temkitthawon, P., Chuenchon, K., Yuyaem, T., & Thongnoi, W. (2003). Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plants used in Thai traditional rejuvenating and neurotonic remedies. *Journal of Ethnopharmacology*, 89, 261–264.
- Jaiswal, R., Kiprotich, J. & Kuhnert, N. (2011). Determination of the hydrocinnamate profile of 12 members of the Asteraceae family. *Phytochemistry*, 72, 781-790.
- Jarvie, E. M., Celtek, S. & Sanger, G. J. (2008). Potentiation by cholinesterase inhibitors of cholinergic activity in rat isolated stomach and colon. *Pharmacological Research*, 58, 297-301.

- Johnson, R. H., Hull-Sanders, H. M. & Meyer, G. A. (2007). Comparison of foliar terpenes between native and invasive *Solidago gigantea*. *Biochemical Systematics and Ecology*, XX, 1-10.
- Kamchonwongpaisan, S. & Meshnick, S. R. (1996). The mode of action of the antimalarial artemisinin and its derivatives. *General Pharmacology*, 27, 587-592.
- Khadri, A., Neffati, M., Smiti, S., Falé, P., Lino, A. R. L., Serralheiro, M. L. M. & Araújo, M. E. M. (2009). Antioxidant, antiacetylcholinesterase and antimicrobial activities of *Cymbopogon schoenanthus* L. Spreng (lemon grass) from Tunisia. *Food Science and Technology*, 43, 331-336.
- Kern, S. M., Bennett, N., Needs, P. W., Mellon, F. A., Kroon, P. A. & Garcia-Conesa, M. T. (2003). Characterization of metabolites of hydroxycinnamates in the *in vitro* model of human small intestinal epithelium Caco-2 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 7884-7891.
- Konishi, Y. & Kobayashi, S. (2004a). Transepithelial transport of chlorogenic acid, caffeic acid, and their colonic metabolites in intestinal Caco-2 cell monolayer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 2518-2526.
- Konishi, Y. & Kobayashi, S. (2004b). Microbial metabolites of ingested caffeic acid are absorbed by the monocarboxylic acid transporter (MCT) in intestinal Caco-2 cell monolayers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 6418-6424.
- Kuspradini, H., Mitsunaga, T. & Ohashi, H. (2009). Antimicrobial activity against *Streptococcus sobrinus* and glucosyltransferase inhibitory activity of taxifolin and some flavanone rhamnosides from kempas (*Koompassia malaccensis*) extracts. *The Japan Wood Research Society*, 55, 308-313.
- Lev, E. (2002). The Doctrine of Signatures in the Medieval and Ottoman Levant, *Vessalius*, VIII, 1, 13-22.
- Lietava, J. (1992). Medicinal plants in a Middle Paleolithic grave Shanidar IV? *Journal of Ethnopharmacology*, 35, 263-266.
- Linford, J. (2007). A concise guide to herbs. Bath: Parragon Books
- Liu, K., Rossi, P. G., Ferrari, B., Berti, L., Casanova, J. & Tomi, F. (2007). Composition, irregular terpenoids, chemical variability and antibacterial activity of the essential oil from *Santolina corsica* Jordan et Fourr. *Phytochemistry*, 68, 1698-1705.
- Logu, A., Loy, G., Pellerano, M. L., Bonsignore, L. & Schivo, M. L. (2000). Inactivation of HSV-1 and HSV-2 and prevention of cell-to-cell virus spread by *Santolina insularis* essential oil. *Antiviral Research*, 48, 177-185.
- Lopes, J. L. C. (1991). Sesquiterpene lactones from *Vernonia*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 86, 221-230.
- Lourens, A. C. U., Viljoen, A. M. & van Heerden, F. R. (2008). South African *Helichrysum* species: A review of the traditional uses, biological activity and phytochemistry. *Journal of Ethnopharmacology*, 119, 630-652.

- Malik, S., Cusidó, R. M., Mirjalili, M. H., Moyano, E., Palázon, J. & Bonfill, M. (2011). Production of the anticancer drug taxol in *Taxus baccata* suspension culture: A review. *Process Biochemistry*, 46, 23-34.
- Mastelic, J., Politeo, O., Jerkovic, I. & Radosevic, N. (2005). Composition and antimicrobial activity of *Helichrysum italicum* essential oils and its terpene and terpenoid fractions. *Chemistry of Natural Compounds*, 41, 35-40.
- Mata, A. T., Proença, C., Ferreira, A. R., Serralheiro, M. L. M., Nogueira, J. M. F. & Araújo, M. E. M. (2007). Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food species. *Food Chemistry*, 103, 778-786.
- Matharu, B., Gibson, G., Parsons, R., Huckerby, T. N., Moore, S. A., Cooper, L. J., Millichamp, R., Allsop, D. & Austen, B. (2009). Galantamine inhibits  $\beta$ -amyloid aggregation and cytotoxicity. *Journal of Neurological Sciences*, 280, 49-58.
- Melzig, M. F., (2004). Echtes Goldrutenkraut – ein klassiker in der urologischen phytotherapie. *Wiener Medizinische Wochenschrift*, 154, 523-527.
- Metcalf, C. R. & Chalk, L. (1988). *Anatomy of the dicotyledons*. Oxford: Clarendon Press.
- Monteiro, W. R., Castro, M. M., Viveiros, S. C. M. & Mahlberg, P.G. (2001). Development and some histochemical aspects of foliar glandular trichomes of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bert. - Asteraceae. *Revista Brasileira de Botânica*, 24, 349-357.
- More, G., Tshikalange, T. E., Lall, N., Botha, F. & Meyer, J. J. M. (2008). Antimicrobial activity of medicinal plants against oral microorganisms. *Journal of Ethnopharmacology*, 119, 473-477.
- Mukherjee, P. K., Kumar, V., Mal, M. & Houghton, P. J. (2007). Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomedicine*, 14, 289-300.
- Neves, J. M., Matos, C., Moutinho, C., Queiroz, G. & Gomes, L. R. (2009). Ethnopharmacological notes about ancient uses of medicinal plants in Trás-os-Montes (northern of Portugal). *Journal of Ethnopharmacology*, 24, 270-283.
- Neu, R. & Neuhoﬀ, E. (1957) Eine Methode zur Identifizierung papierchromatographisch aufgetrennter Flavone und ihrer Spaltprodukte, dargestellt am Kampferol aus *Aesculus hippocastanum* L. in: Opitz, S., Schnitzler, J. P., Hause, B. & Schneider, B. (2003). Histochemical analysis of phenylphenalenone-related compounds in *Xiphidium caeruleum* (Haemodoraceae). *Planta*, 216, 881-889.
- Nikolova, M., Evstatieva, L. & Nguyen, T. D. (2011). Screening of plant extracts for antioxidant properties. *Botanica Serbica*, 35, 43-48.
- Nostro, A., Cannatelli, M. A., Crisafi, G., Musolino, A. D., Procopio, F. & Alonzo, V. (2004). Modifications of hydrophobicity, *in vitro* adherence and cellular aggregation of *Streptococcus mutans* by *Helichrysum italicum* extract. *Letters in Applied Microbiology*, 38, 423-427.
- Oliveira, V. C. & Bastos, E. M. (1999). Aspectos morfo-anatômicos da folha de *Baccharis dracunculifolia* DC. (Asteraceae) visando a identificação da origem botânica da própolis. *Acta Botanica Brasílica*, 12, 431-439.
- Oonsivilai, R., Ferruzi, M. G. & Ningsanond, S. (2007). Antioxidant activity and cytotoxicity of rang chuet (*Thunbergia laurifolia* Lindl.) extracts. *Asian Journal of Food and Agro-Chemistry*, 1, 116-118.

- Pagni, A. M. (1995). Secretory structures in the capitula of *Santolina leucantha* Bertol. (Asteraceae). Morphology and histochemistry. *Annals of Botany (Roma)*, 53, 239-249.
- Pagni, A. M., Orlando, R., Masini, A. & Ciccarelli, D. (2003). Secretory structures of *Santolina ligustica* Arrigoni (Asteraceae), an Italian endemic species. *Israel Journal of Plant Sciences*, 51, 185-192.
- Paleari, L., Grozio, A., Cesario, A. & Russo, P. (2008). The cholinergic system and cancer. *Seminars in Cancer Biology*, 18, 211-217.
- Palombo, E. A. (2009). Traditional medicinal plant extracts and natural products with activity against oral bacteria: potential application in the prevention and treatment of oral diseases. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2011, 1-15.
- Pasha, S. F., Lunsford, T. N. & Lennon, V. A. (2006). Autoimmune gastrointestinal dysmotility treated successfully with pyridostigmine. *Gastroenterology*, 131, 1592-1596.
- Pereira, D. M., Valentão, P., Pereira, J. A. & Andrade, P. B. (2009). Phenolics: From chemistry to biology. *Molecules*, 14, 2202-2211.
- Pimplikar, S. W. (2009). Reassessing the amyloid cascade hypothesis of Alzheimer's disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 41, 1261-1268.
- Plazonic, A., Bucar, F., Males, Z., Mornar, A., Nigovic, B. & Kujundzic, N. (2009). Identification and quantification of flavonoids and phenolic acids in burr parsley (*Caucalis platycarpos* L.), using high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization mass spectroscopy. *Molecules*, 14, 2466-2490.
- Porfirio, S., Falé, P., Madeira, P. J. A., Florêncio, M. H., Ascensão, L. & Serralheiro, M. L. M. (2010). Antiacetylcholinesterase and antioxidant activities of *Plectranthus barbatulus* tea, after *in vitro* gastrointestinal metabolism. *Food Chemistry*, 122, 179-187.
- Priede, A. (2008). Invasive non-native *Solidago* species in Latvia: Expansion history and current distribution. *Proceedings of the Latvia Academy of Sciences*, 62, 78-83.
- Rand, J. B. (2007). Acetylcholine. In: The *Caenorhabditis elegans* Research Community (ed). *Wormbook*. [www.wormbook.org](http://www.wormbook.org); doi/10.1895/wormbook.1.131.1
- Rivera, N. D. & Obón, C. C. (1993). Ethnopharmacology of Murcia (SE Spain). *Médicaments et aliments: L'Approche Ethnopharmacologique*, 215-239.
- Rivero-Guerra, A. O. (2009). Cytogenetics, geographical distribution, pollen stainability and fecundity of *Santolina impressa* (Asteraceae: Anthemideae). *Folia Geobotânica*, 45, 95-109.
- Rosa, A., Pollastro, F., Atzeri, A., Appendino, G., Melis, M. P., Deiana, M., Incani, A., Loru, D. & Dessì, M. A. (2011). Protective role of arzanol against lipid peroxidation in biological systems. *Chemistry and Physics of Lipids*, 164, 24-32.
- Sacchetti, G., Romagnoli, C., Ballero, M., Tosi, B. & Poli, F. (1997). Internal secretory structures and preliminary phytochemical investigation on flavonoid and coumarin content in *Santolina insularis* (Asteraceae). *Phyton*, 37, 219-238.
- Sala, A., Recio, M. C. R., Giner, R. M., Máñez, S. & Ríos, J. L. (1999). Anti-phospholipase A<sub>2</sub> and anti-inflammatory activity of *Santolina chamaecyparissus*. *Pharmacology Letters*, 66, 35-40.

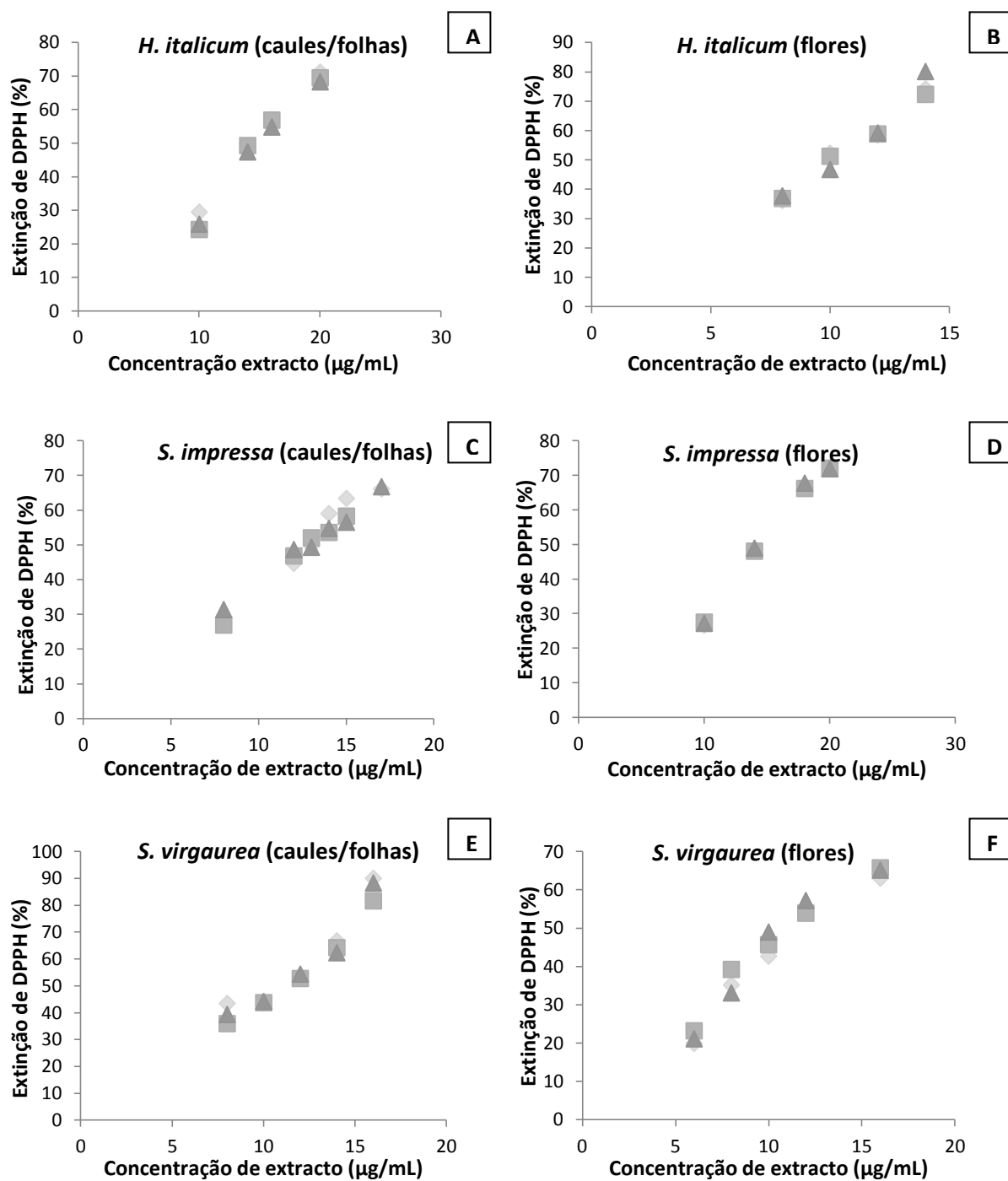
- Sala A., Recio, M. C., Giner, R. M., Máñez, S. & Ríos, J. L. (2001). New acetophenone glucosides isolated from *Helichrysum italicum* with antiinflammatory activity. *Journal of Natural Products*, 64, 1360-1362.
- Sasho, S., Obase, H., Ichikawa, S., Kitazawa, T., Nonaka, H., Yoshizaki, R., Ishii, A. & Shuto, K. (1994). Synthesis of 2-imidazolidinylidene propanedinitrile derivatives as stimulators of gastrointestinal motility – III. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 3, 279-287.
- Silva, L. J. F. (2010). Atividades biológicas e estruturas secretoras em *Artemisia campestris* e *Helichrysum stoechas* (Asteraceae). Acedido em: <http://hdl.handle.net/10451/2777>.
- Silva, A. G., Sousa, C. P. G., Koehler, J., Fontana, J., Christo, A. G. & Guedes-Bruni, R. R. (2010). Evaluation of an extract of brazilian arnica (*Solidago chilensis* Meyen, Asteraceae) in treating lumbago. *Phytotherapy Research*, 24, 283-287.
- Sinne, J. P., Ferrand, R., Cloarec, D., Lehur, P. A. & Colas, B. (1991). Human intestine epithelial cell acetyl- and butyrylcholinesterase. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 108, 145-149.
- Smith, M. A., Rottkamp, C. A., Numomura, A., Raina, A. K. & Perry, G. (2000). Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1502, 139-144.
- Spencer, J. P. E. (2008). Flavonoids: modulators of brain function?. *British Journal of Nutrition*, 99, ES60-ES70.
- Steele, M., Stuchbury, G. & Much, G. (2007). The molecular basis of the prevention of Alzheimer's disease through healthy nutrition. *Experimental Gerontology*, 42, 28-36.
- Sumner, J. (2000). *The natural history of medicinal plants*. Hong Kong: Timber Press.
- Suresh, B., Sriram, S., Dhanaraj, S. A., Elango, K. & Chinnaswamy, K. (1997). Anticandidal activity of *Santolina chamaecyparissus* volatile oil. *Journal of Ethnopharmacology*, 55, 151-159.
- Tamura, E. K., Jimenez, R. S., Waismam, K., Gobbo-Neto, L., Lopes, N. P., Malpezzi-Marinho, E. A. L., Marinho, E. A. V. & Farsky, S. H. P. (2009). Inhibitory effects of *Solidago chilensis* Meyen hydrialcoholic extract on acute inflammation. *Journal of Ethnopharmacology*, 122, 478-485.
- Takjarimi, M. M., Ibrahim, S. A. & Cliver, D. O. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*, 21, 1199-1218.
- Tepe, B., Daferera, D., Sokmen, A., Sokmen, M., & Polissiou, M. (2005). Antimicrobial and antioxidant activities of essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (*Lamiaceae*). *Food Chemistry*, 90, 333-340.
- Tepe, B., Sokmen, M., Akpulat, H. A. & Sokmen, A. (2005). *In vitro* antioxidant activities of the methanol extracts of four *Helichrysum* species from Turkey. *Food Chemistry*, 90, 685-689.
- Tian, X. J., Yang, X. W., Yang, W. & Wang, K. (2008). Studies of intestinal permeability of 36 flavonoids using Caco-2 cell monolayer model. *International Journal of Pharmaceutics*, 367, 58-64.
- Tichy, J. & Novak, J. (2008). Extraction, assay, and analysis of antimicrobials from plants with activity against dental pathogens (*Streptococcus* sp.). *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 4, 1-39.

- Vinutha, B., Prashanth, D., Salma, K., Sreeja, S. L., Pratiti, D., Padmaja, R., Radhika, S., Amit, A., Venkateshwarlu, K., Deepak, M. (2007). Screening of selected Indian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 109, 359-363.
- Vitto, L. A. & Petenatti, E. M. (2009). Asteráceae de importancia económica y ambiental. Primera Parte. Sinopsis morfológica y taxonómica, importancia ecológica y plantas de interés industrial. *Multequina*, 18, 87-115.
- Weber, E. & Jakobs, G. (2005). Biological flora of Central Europe: *Solidago gigantea* Aiton. *Flora*, 200, 109-118.
- Werker, E. & fahn, A. (1981). Secretory hairs of *Inula viscosa* L. Ait - development, ultrastructure and secretion. *Botanical Gazette*, 142, 461-476.
- White, P., Goodhardt, M. J., Keet, J. P., Hiley, C. R., Carrasco, L. H., Williams, I. E. I. & Bowen, D. M. (1977). Neocortical cholinergic neurons in elderly people. *The Lancet*, 309, 668-671.
- World Health Organization (2008). Traditional Medicine. Acedido em 2011 de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en/>.
- Yang, S. Z. (1998). *The divine farmer's material medica* (1<sup>st</sup> ed). Boulder, CO: Blue Poppy Press.
- Yamamoto, Y., Takahashi, Y., Kawano, M., Iizuka, M., Matsumoto, T. & Saeki, S., (1999). *In vitro* digestibility and fermentability of levan and its hypocholesterolemic effects in rats. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 10, 13-18.
- Yarnell, E. (2002). Botanical medicines for the urinary tract. *World Journal Urol*, 20, 285-293.

## VIII. Anexos

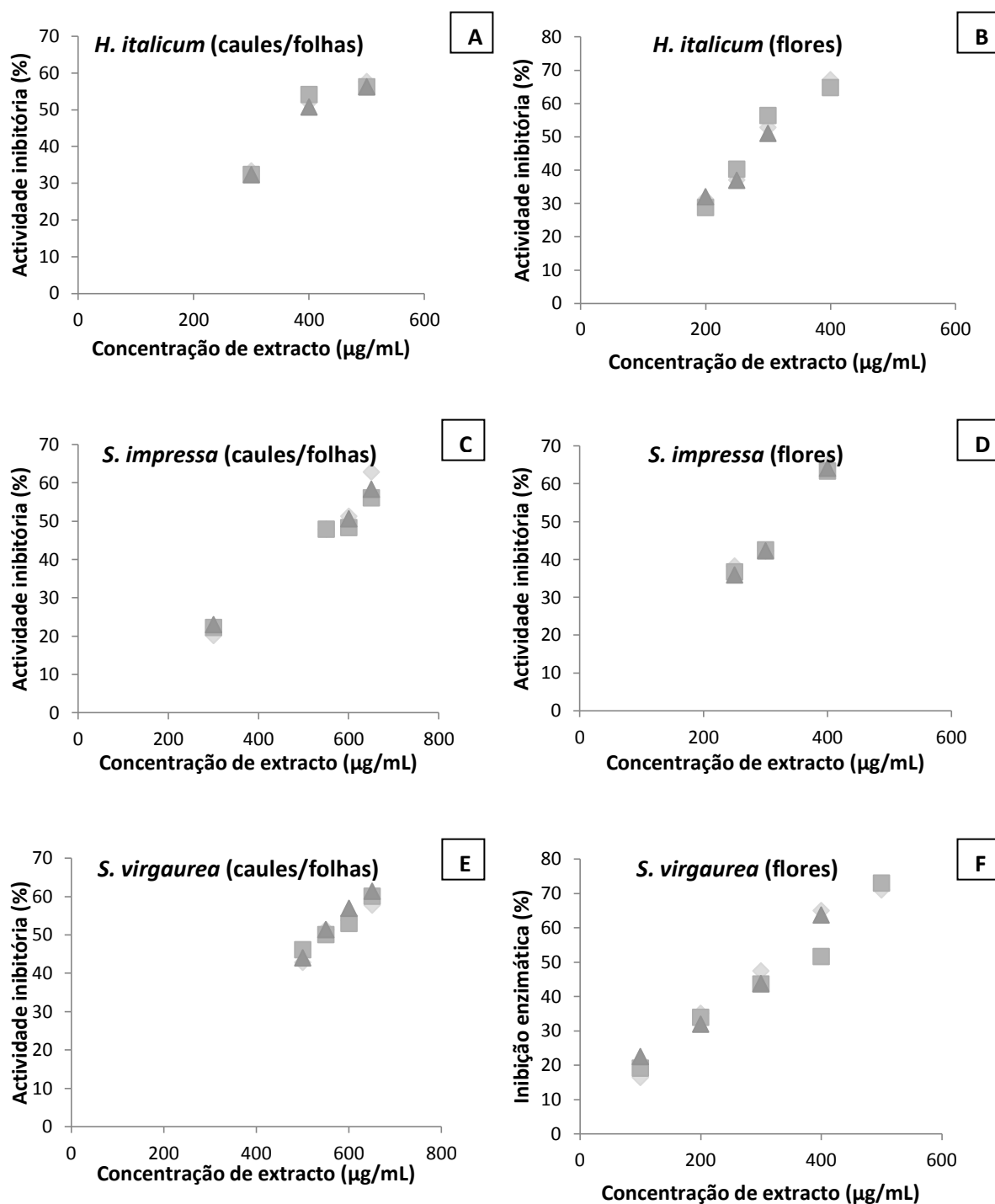
---

**Anexo A** – Representação gráfica da extinção do radical DPPH (%) em função da concentração dos extractos aquosos ( $\mu\text{g/mL}$ ) de *H. italicum* (A – caules/folhas e B – flores), *S. impressa* (C – caules/folhas e D – flores) e *S. virgaurea* (E – caules/folhas e F – flores). Ensaio realizado em triplicado para cada uma das concentrações.

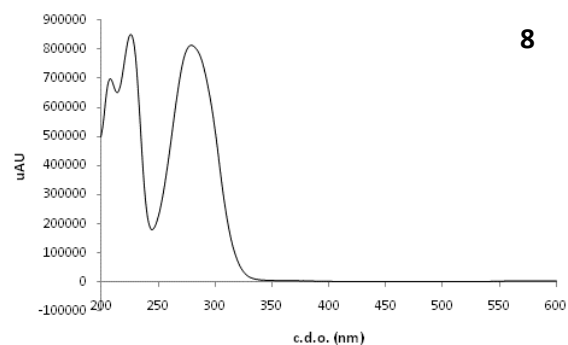
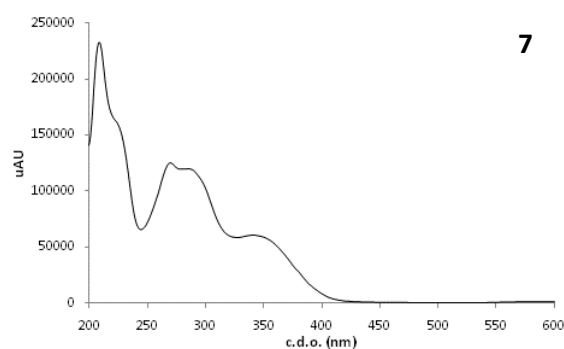
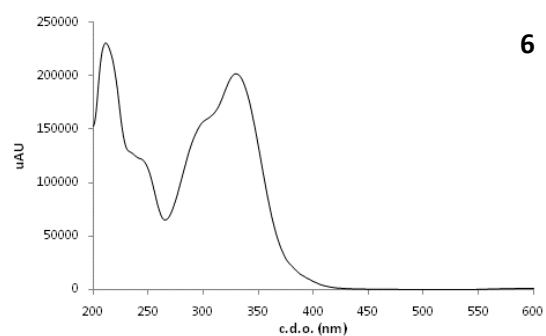
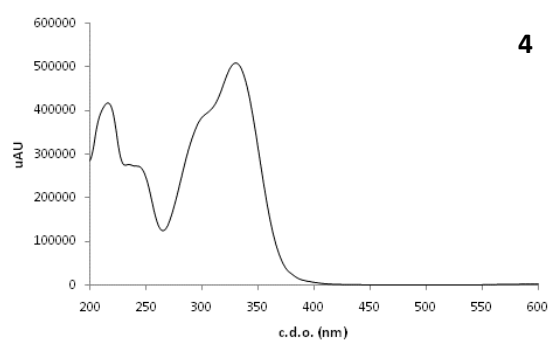
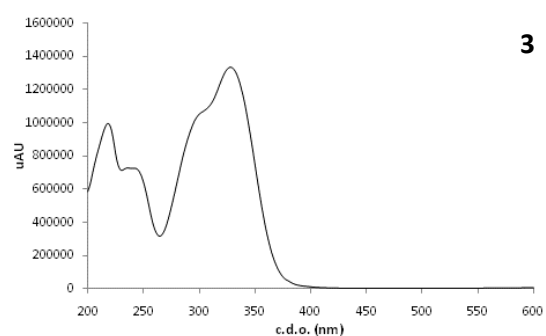
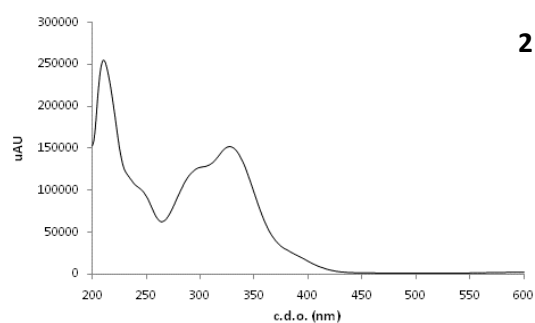
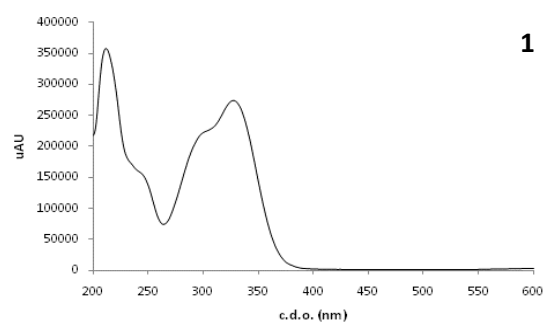




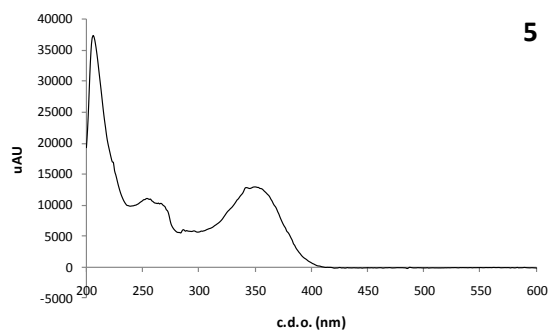
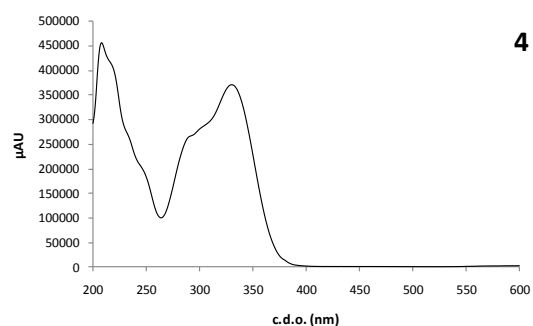
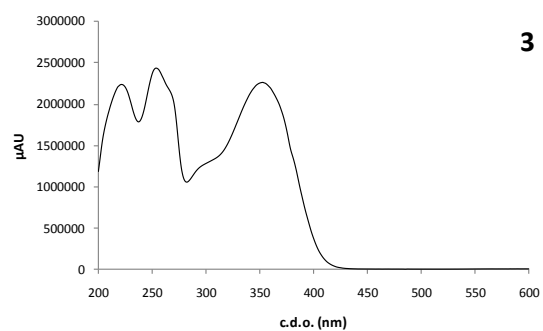
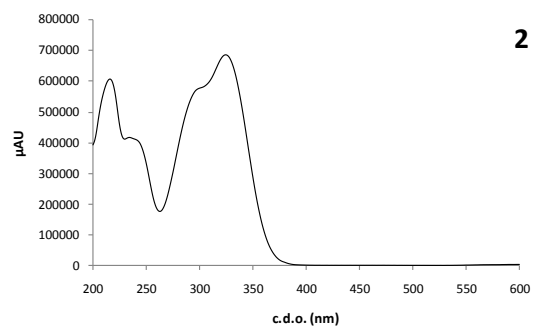
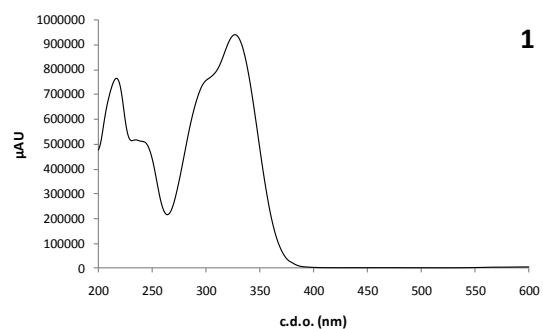
**Anexo B** – Representação gráfica da inibição da actividade enzimática (%) em função da concentração dos extractos aquosos ( $\mu\text{g/mL}$ ) de *H. italicum* (A – caules/folhas e B – flores), *S. impressa* (C – caules/folhas e D – flores) e *S. virgaurea* (E – caules/folhas e F – flores). Ensaio realizado em triplicado para cada uma das concentrações.



**Anexo C** - Espectros de absorção UV-Visível obtidos por HPLC-DAD para os oito picos maioritários do extracto aquoso de flores de *H. italicum* (1mg/mL): 1 (Tr = 8,15 min), 2 (Tr = 16,14 min), 3 (Tr = 17,38 min), 4 (Tr = 18,86 min), 5 (Tr = 21,79 min), 6 (Tr = 23,31 min) e 7 (Tr = 39,40 min).

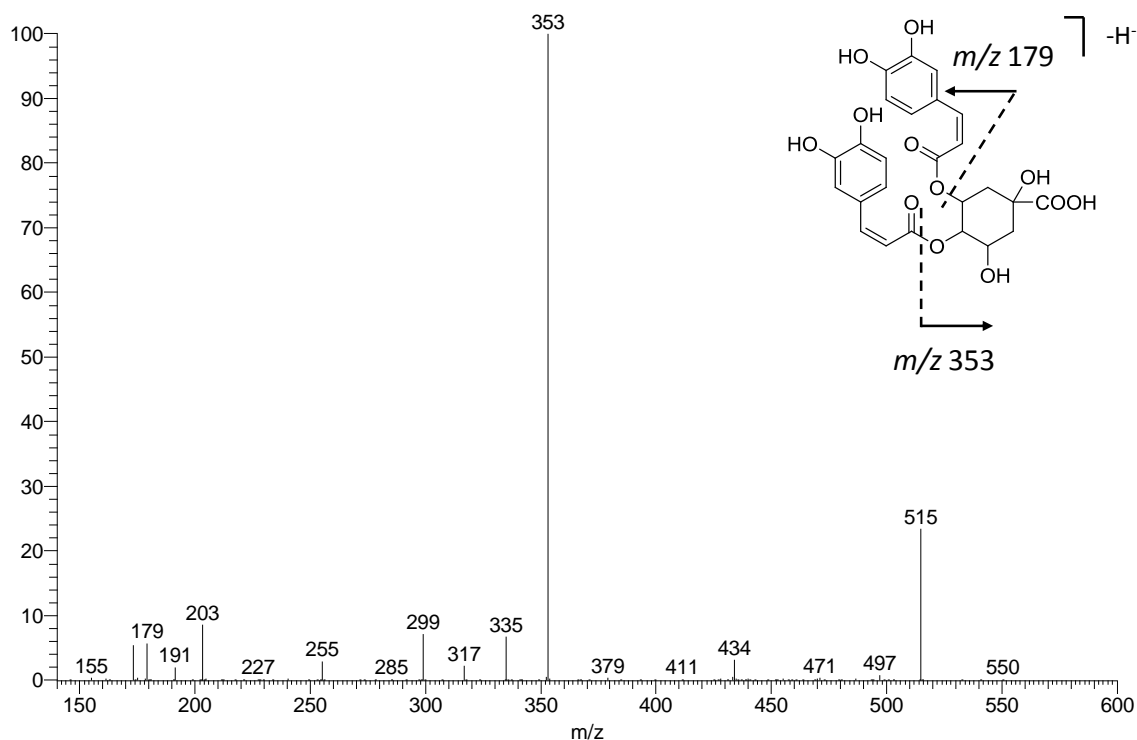


**Anexo D** - Espectros de absorção UV-Visível obtidos por HPLC-DAD para os padrões: 1 - ácido clorogênico (Tr = 8,17 min), 2 - ácido cafeíco (Tr = 10,73 min), 3 - rutina (Tr = 18,37 min), 4 - ácido rosmarínico (Tr = 19,55 min) e 5 - luteolina (Tr = 31,83 min).

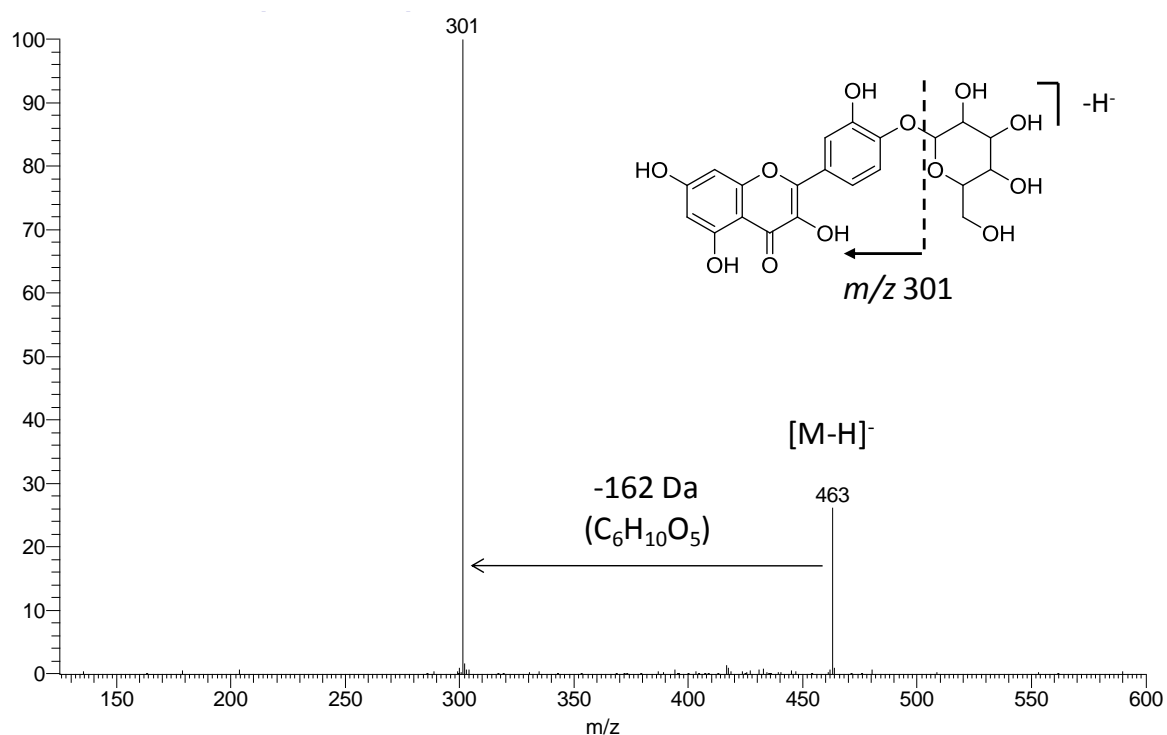


**Anexo E** – Espectros de massa, estrutura química e padrão de fragmentação dos compostos presentes no extracto aquoso de caule/folhas de *H. italicum*. *A* – 3,4-ácido dicafeoilquínico, *B* – quercetina-4-glucósido, *C* – canferol-3-glucósido, *D* – apigenina-7-O-glucósido.

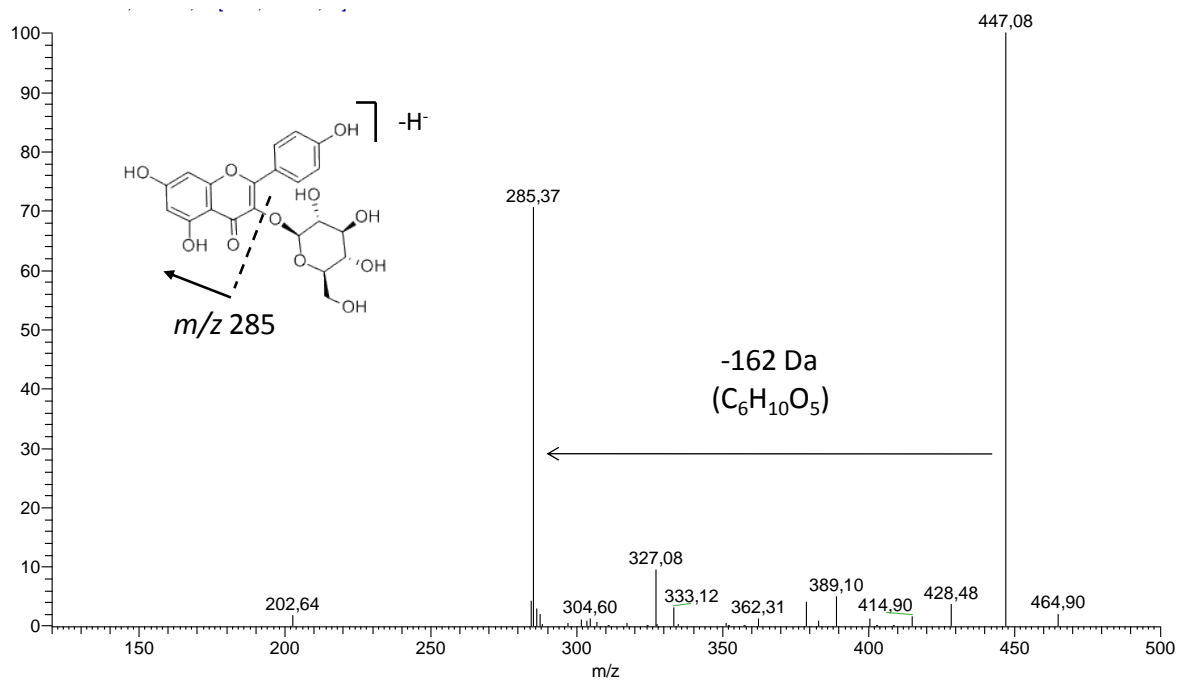
*A* – 3,4-ácido dicafeoilquínico (Tr = 16,15 min).



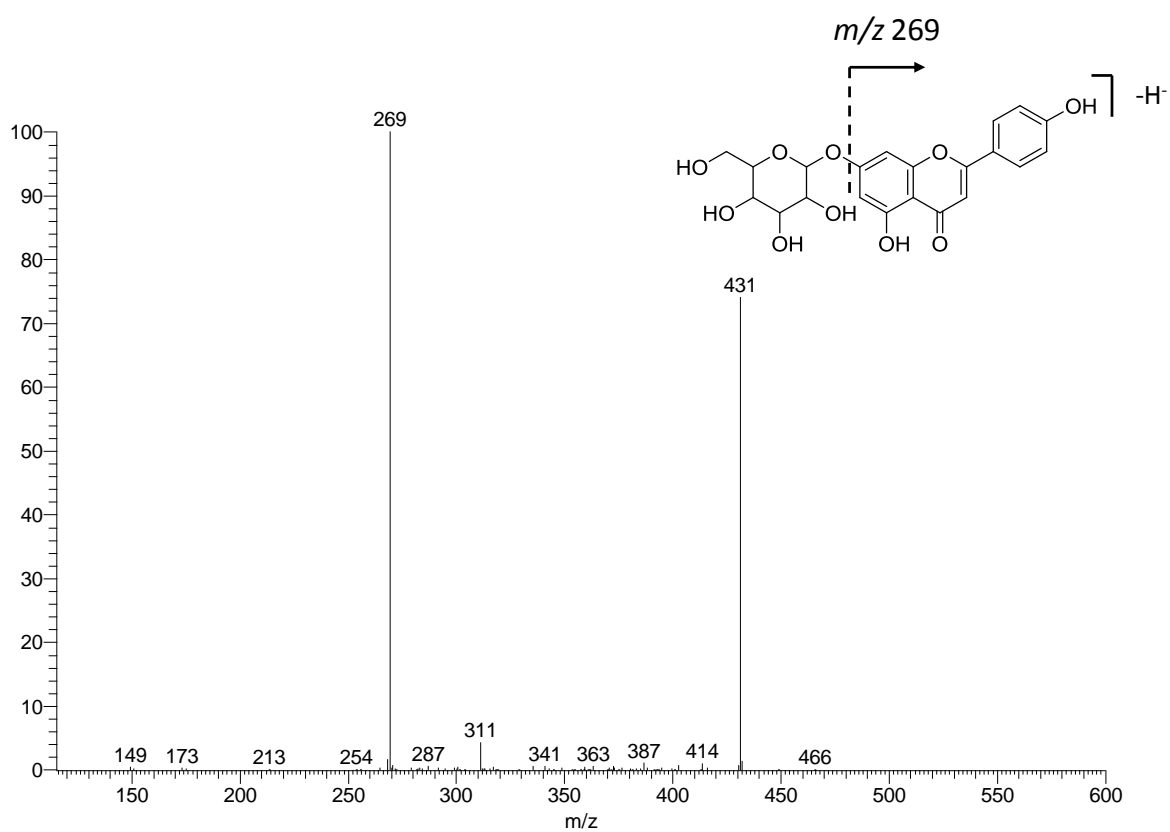
*B* – quercetina-4-glucósido (Tr = 17,35). Consistente com o espectro do MassBank (nº PR051498).

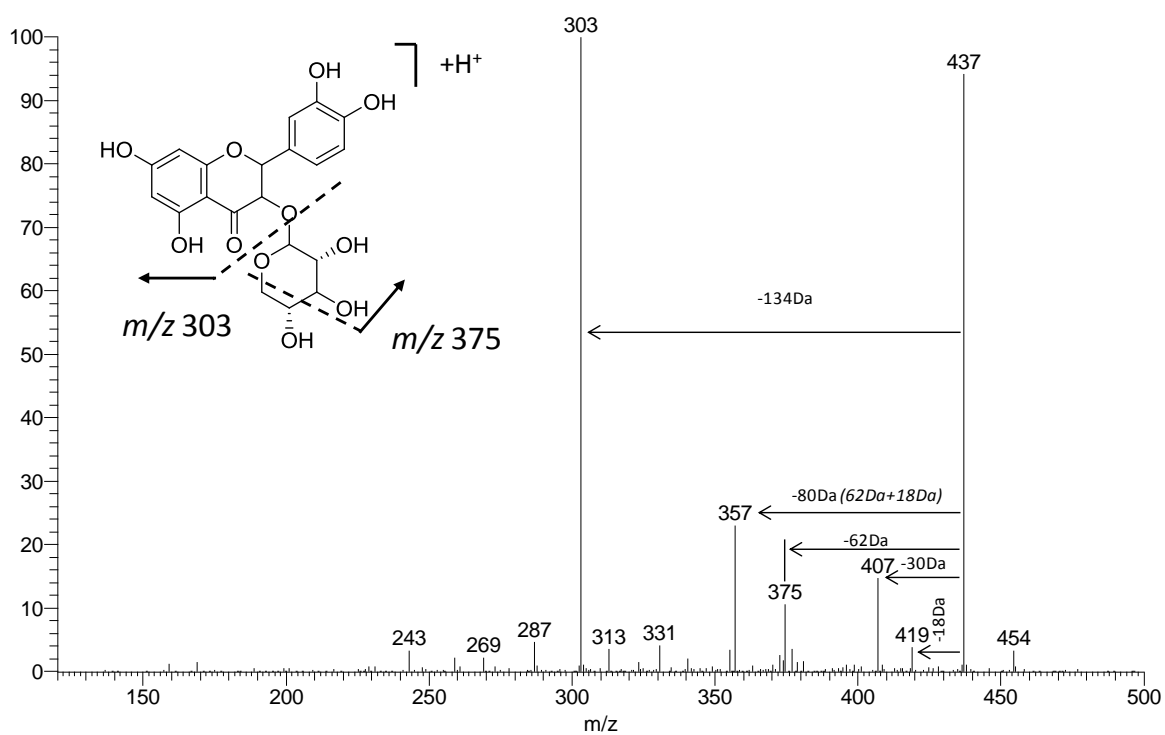


*C* – canferol-3-glucósido (Tr = 21,76).

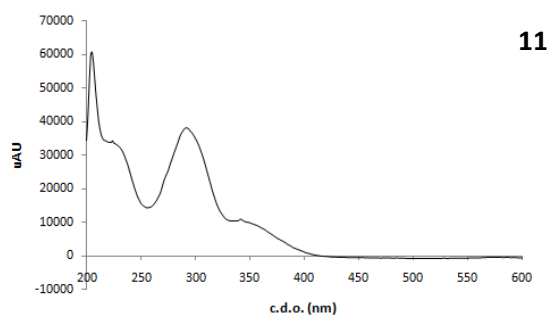
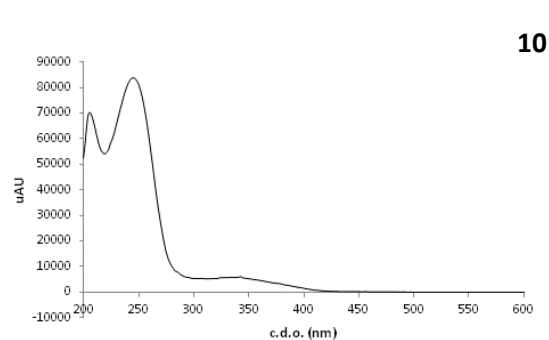
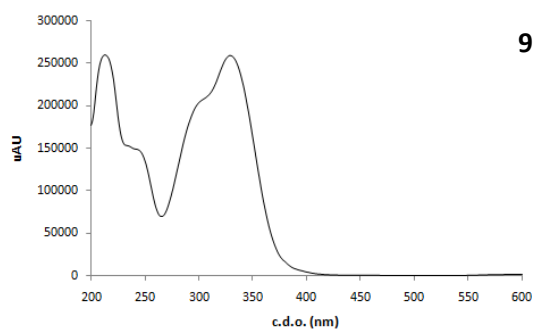
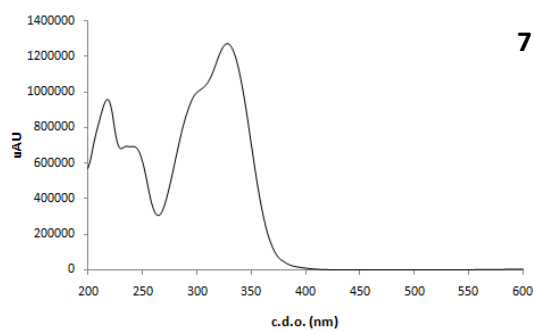
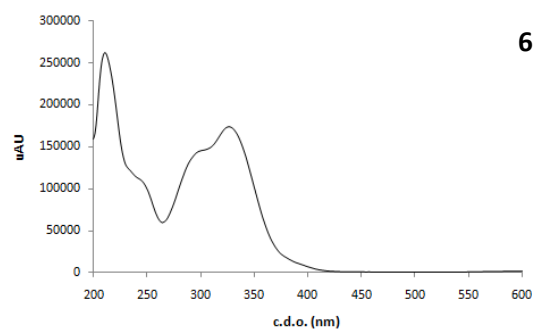
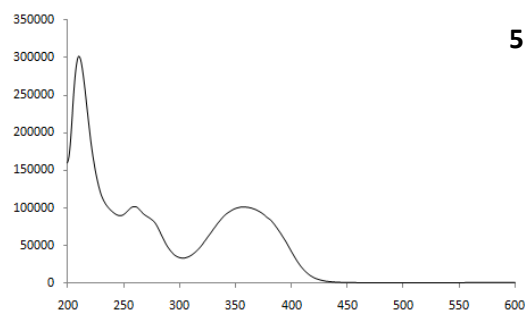
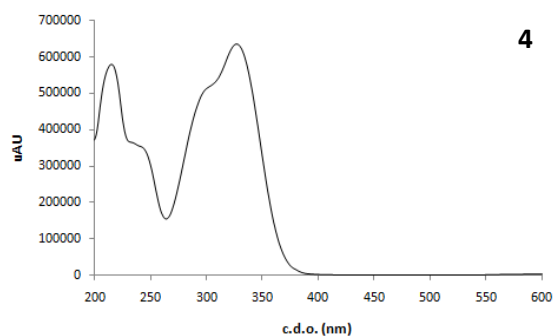


*D* – Apigenina-7-O-glucósido (Tr = 23,28 min).

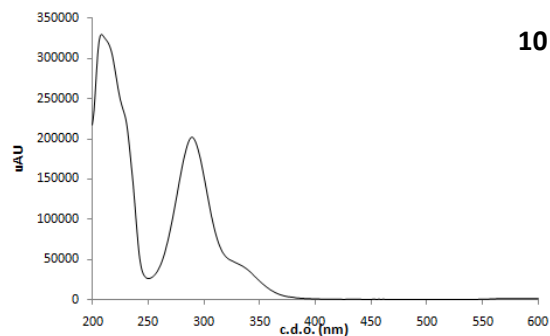
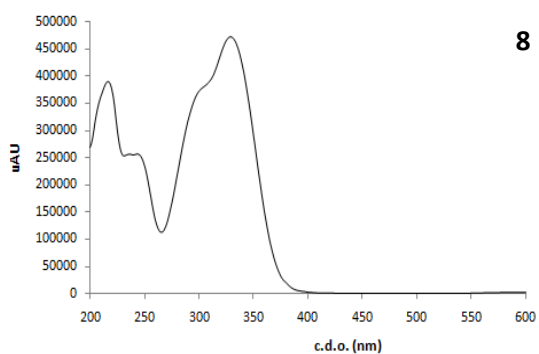
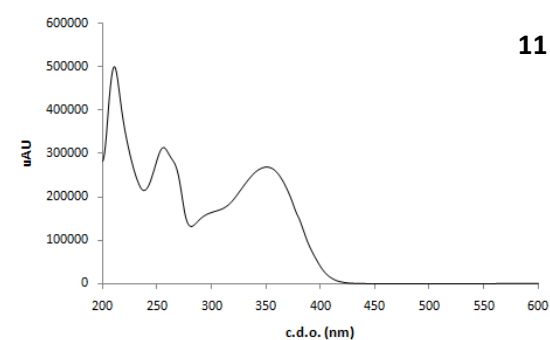
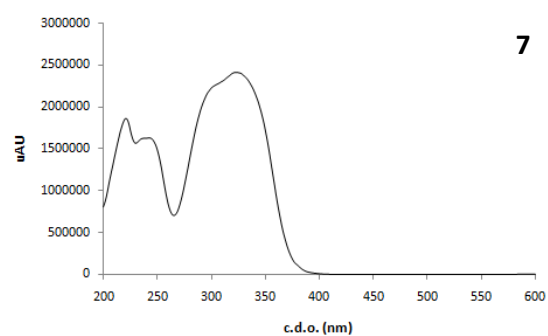
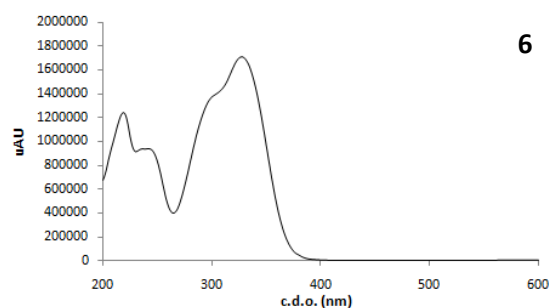
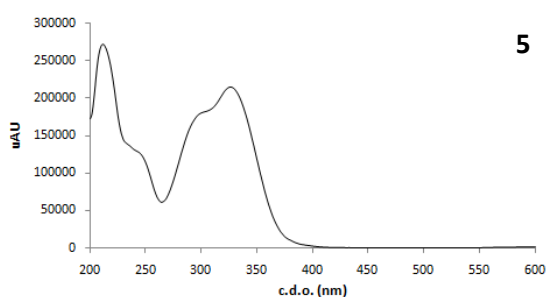
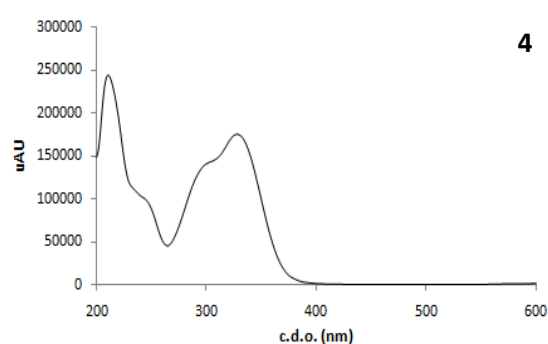
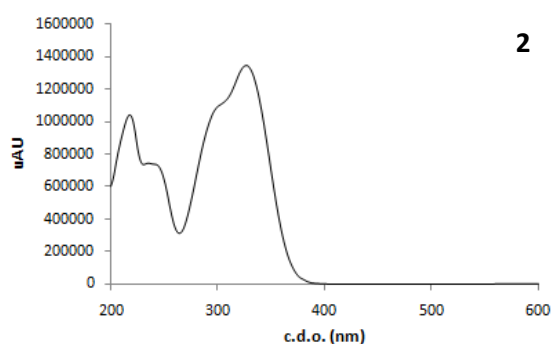


*E* – Taxifolina-3-O-xilósido

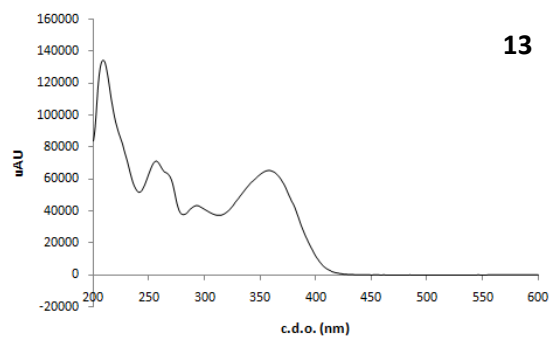
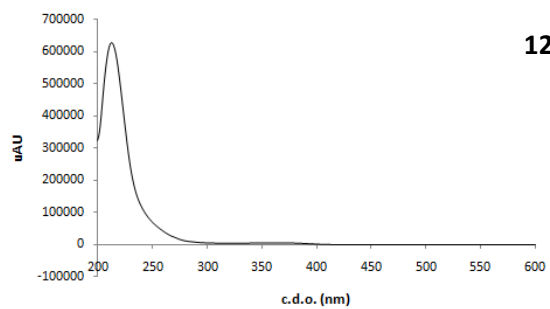
**Anexo F** – Espectros de absorção UV-Visível obtidos por HPLC-DAD para os oito picos maioritários do extracto aquoso de flores de *S. impressa* (1mg/mL): 4 (Tr = 8,18 min), 5 (Tr = 12,36 min), 6 (Tr = 16,25 min), 7 (Tr = 17,47 min), 9 (Tr = 21,88 min), 10 (Tr = 30,57 min) e 11 (Tr = 37,61 min).



**Anexo G** – Espectros de absorção UV-Visível obtidos por HPLC-DAD para os oito picos maioritários do extracto aquoso de flores de *S. virgaurea* (1mg/mL): 2 (Tr = 8,28 min), 4 (Tr = 15,02 min), 5 (Tr = 16,41 min), 6 (Tr = 17,62 min), 7 (Tr = 19,10 min), 8 (Tr = 22,02 min), 10 (Tr = 26,64 min), 12 (Tr = 31,23) e 13 (Tr = 31,91).







**Anexo H** – Cromatograma de HPLC-DAD do suco pancreático artificial utilizado nos ensaios de digestão dos extractos aquosos. O pico P corresponde ao enzima pancreatina.

